

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Institut für Ernährungswissenschaften

Lehrstuhl Lebensmittelchemie



**Vergleichende Untersuchungen zur Toxinbildung
durch Cyanobakterien unterschiedlicher Provenienz**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Thomas Krüger (*Dipl. troph.*)

geboren am 6. März 1981 in Gardelegen

Januar 2010

Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Luckas (FSU Jena)

Prof. Dr. Ralf Oelmüller (FSU Jena)

Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk (TU Kaiserslautern)

Datum der öffentlichen Verteidigung:

26.04.2010

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	V
III	Tabellenverzeichnis	VIII
IV	Abkürzungsverzeichnis	X
1	Einleitung	1
2	Chemische Struktur, Toxizität und Vorkommen cyanobakterieller Toxine	2
2.1	Hepatotoxine	2
2.1.1	Microcystine	2
2.1.2	Nodularine	6
2.1.3	Cylindrospermopsine	8
2.2	Neurotoxine	9
2.2.1	Anatoxin-a	9
2.2.2	Anatoxin-a(s)	11
2.2.3	β -N-Methylamino-L-Alanin (BMAA) und 2,4-Diaminobuttersäure (DAB)	12
2.2.4	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) - Toxine	19
2.3	Expositionsquellen cyanobakterieller Toxine und rechtliche Regelungen zum Schutz der Gesundheit	22
2.3.1	Oberflächenwasser	23
2.3.1.1	Trinkwasser	23
2.3.1.2	Badegewässer	24
2.3.2	Hämodialyse	25
2.3.3	Nahrungsergänzungsmittel auf Mikroalgenbasis	25
2.3.4	Aquatische Organismen als menschliche Nahrungsquellen	32
2.4	Einfluss von Kultivierungsfaktoren auf die Toxinproduktion von Cyanobakterien	33
2.4.1	Einfluss abiotischer Faktoren	33
2.4.2	Einfluss biotischer Faktoren	35
2.4.3	Bedeutung der Kryopreservation	36
3	Zielstellungen der Arbeit	37
4	Material und Methoden	39
4.1	Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter auf das Wachstum und die Toxinproduktion ausgewählter Cyanobakterien	39
4.1.1	Auswahl der Organismen	39
4.1.2	Kultivierung	39
4.1.2.1	Variation des Nitratgehaltes im Medium	40
4.1.2.2	Variation des Phosphatgehaltes im Medium	40
4.1.2.3	Variation des pH-Wertes im Medium	41
4.1.2.4	Nutzung von gebrauchtem Medium (GM)	41
4.1.2.5	Kryopreservation von Cyanobakterien	41
4.1.3	Ermittlung der Wachstumsparameter	42
4.1.3.1	Bestimmung des Trockengewichts	42
4.1.3.2	Bestimmung des Gehaltes an Chlorophyll-a	42

4.1.4 Bestimmung der Toxinproduktion.....	43
4.1.4.1 Zellernte und Extraktion cyanobakterieller Toxine.....	43
4.1.4.2 LC-MS-Bestimmung von Microcystinen.....	43
4.1.4.3 LC-MS-Bestimmung von Anatoxin-a.....	44
4.1.4.4 Quantifizierung.....	44
4.1.5 Experimenteller Aufbau.....	44
4.1.6 Statistische Signifikanz.....	45
4.2 Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS-basierten Methode zur Bestimmung von BMAA und DAB in Cyanobakterien.....	45
4.2.1 Standardsubstanzen.....	45
4.2.2 Probenmaterial.....	45
4.2.3 Probenaufbereitung.....	46
4.2.4 Bestimmung der Wiederfindungsrate.....	46
4.2.5 LC-MS/MS-Bestimmung von BMAA und DAB.....	46
4.2.6 Quantifizierung.....	48
4.3 Vorkommen und Nachweis desmethylierter cyanobakterieller Peptidtoxine.....	48
4.3.1 Standardsubstanzen.....	48
4.3.2 Probenmaterial.....	48
4.3.3 Extraktion cyanobakterieller Peptidtoxine.....	48
4.3.4 Bestimmung cyanobakterieller Peptidtoxine mittels HPLC-UV.....	49
4.3.5 Bestimmung cyanobakterieller Peptidtoxine mittels LC-MS(/MS).....	49
4.3.6 Bestimmung cyanobakterieller Peptidtoxine mittels LC-MS- <i>IonTrap</i>	50
4.3.7 Mikrowellen-unterstützte Hydrolyse von MC-Fractionen.....	50
4.3.8 Derivatisierung der freien Amino- und Ketosäuren.....	50
4.3.9 GC-MS-Bestimmung der derivatisierten Amino- und Ketosäuren.....	51
4.4 Optimierung einer Multikomponentenmethode zur flüssigchromatografischen Trennung und massenspektrometrischen Detektion cyanobakterieller Toxine.....	52
4.4.1 Standardsubstanzen und Probenmaterial.....	52
4.4.2 Differenzierte Bestimmung von Anatoxin-a und Phenylalanin.....	52
4.4.2.1 Chromatografische Trennung von Anatoxin-a und Phenylalanin.....	52
4.4.2.2 UV-Detektion von Anatoxin-a und Phenylalanin.....	53
4.4.2.3 MS/MS-Detektion von Anatoxin-a und Phenylalanin.....	53
4.4.3 Chromatografische Trennung eines Multitoxingemisches.....	53
4.4.4 Massenspektrometrische Detektion eines Multitoxingemisches nach chromatografischer Trennung.....	54
5 Ergebnisse und Diskussion.....	55
5.1 Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter auf das Wachstum und die Toxinproduktion ausgewählter Cyanobakterien....	55
5.1.1 Einfluss des Nitratgehaltes im Medium.....	55
5.1.2 Einfluss des Phosphatgehaltes im Medium.....	57
5.1.3 Einfluss des pH-Wertes im Medium.....	60
5.1.4 Einfluss von gebrauchtem Medium.....	63
5.1.5 Einfluss der Kryopreservation.....	65

5.2 Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS-basierten Methode zur Bestimmung von BMAA und DAB in Cyanobakterien.....	67
5.2.1 Chromatografische Trennung.....	67
5.2.2 Tandemmassenspektrometrische Detektion von BMAA und DAB.....	68
5.2.3 Nachweisempfindlichkeit und Validierung der Methode.....	69
5.2.4 Vorkommen von BMAA und DAB in ausgewählten Cyanobakterien.....	70
5.2.5 Kontrovers diskutierte Analysenergebnisse bezüglich des Vorkommens von BMAA und DAB in Cyanobakterien im Kontext einer methodologischen Kritik.....	72
5.3 Vorkommen und Nachweis desmethylierter cyanobakterieller Peptidtoxine.....	74
5.3.1 Bestimmung desmethylierter Peptidtoxine mittels HPLC-UV nach ISO 20179..	74
5.3.2 Chromatografische Trennung desmethylierter Peptidtoxine.....	75
5.3.3 Vorkommen und toxikologische Relevanz von desmethylierten Peptidtoxinen..	77
5.3.4 Strukturaufklärung desmethylierter Peptidtoxine.....	78
5.3.4.1 Tandem-Massenspektrometrie.....	79
5.3.4.2 Ionenfallen-Massenspektrometrie.....	80
5.3.4.3 Analyse der Peptidkomposition mittels GC-MS.....	83
5.4 Optimierung einer Multikomponentenmethode zur flüssigchromatografischen Trennung und massenspektrometrischen Detektion cyanobakterieller Toxine.....	84
5.4.1 Chromatografische Trennung von Anatoxin-a und Phenylalanin.....	84
5.4.2 Massenspektrometrische Fragmentation von Anatoxin-a und Phenylalanin.....	86
5.4.3 Chromatografische Trennung von Multitoxingemischen.....	87
5.4.4 Chromatografische Trennung von Multitoxingemischen unter Einsatz des Ionenpaarreagenzes Tridecafluorheptansäure (TDFHA).....	89
5.4.5 Bestimmung der Nachweisgrenzen.....	91
6 Zusammenfassung / Summary.....	92
7 Literatur.....	101
Publikationen.....	129
Anhang.....	130
Danksagung.....	148
Ehrenwörtliche Erklärung.....	149
Lebenslauf.....	150

II Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1 Chemische Struktur der Microcystine am Beispiel von MC-LR	2
Abb. 2 Chemische Struktur des Nodularins	7
Abb. 3 Chemische Struktur der Cylindrospermopsine	8
Abb. 4 Chemische Struktur der Anatoxine (I) sowie der Epoxy- (II) und Dihydroanatoxine (III)	10
Abb. 5 Fragmentierung von Anatoxin-a (I) und Phenylalanin (II) (Furey et al. 2003a & 2005)	11
Abb. 6 Chemische Struktur von Anatoxin-a(s)	12
Abb. 7 Chemische Struktur der neurotoxischen Isomere BMAA (I) und DAB (II)	13
Abb. 8 Potentielle Biosynthese von BMAA aus geeigneten Präkursoren (Brenner et al. 2003)	14
Abb. 9 Allgemeine chemische Struktur der PSP-Toxine	20
Abb. 10 Mikroskopie der cyanobakteriellen Strains (I) <i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/31 und (II) <i>Anabaena flos-aquae</i> SAG30.87	39
Abb. 11 Dha, Mdha und Dhb als Vorläufer für die Ketosäuren Brenztraubensäure und 2-Ketobuttersäure	51
Abb. 12 Derivatisierung der Aminosäuren (I) zur Bildung von N-TFA-Aminosäure-OMe und der Ketosäuren (II) zur Bildung von PFBoxim-Ketosäure-OTMS	51
Abb. 13 Phänotyp von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei unterschiedlichen Nitratgehalten im Medium	56
Abb. 14 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei variablen Nitratgehalten im Medium	56
Abb. 15 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87 bei variablen Nitratgehalten im Medium	56
Abb. 16 Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei variablen Nitratgehalten im Medium	57
Abb. 17 MC-Ausbeute von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 je Liter Kulturmedium bei variablen Nitratgehalten	57
Abb. 18 Phänotyp von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei unterschiedlichen Phosphatgehalten im Medium	58
Abb. 19 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei variablen Phosphatgehalten im Medium	58
Abb. 20 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87 bei variablen Phosphatgehalten im Medium	58
Abb. 21 Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei variablen Phosphatgehalten im Medium	60
Abb. 22 MC-Ausbeute von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 je Liter Kulturmedium bei variablen Phosphatgehalten	60
Abb. 23 Phänotyp von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei unterschiedlichen pH-Werten im Medium	61
Abb. 24 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei variablem pH-Wert im Medium	61
Abb. 25 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87 bei variablem pH-Wert im Medium	61
Abb. 26 Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 bei variablen pH-Werten im Medium	62
Abb. 27 MC-Ausbeute von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 je Liter Kulturmedium bei variablen pH-Werten	62
Abb. 28 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 in MLAN-Medium und 50 % gebrauchtem Medium (GM) von <i>Synechocystis</i> sp. SAG92.79	64

Abb. 29	Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87 in MLA_N -Medium und 50 % gebrauchtem Medium (GM) von <i>Synechocystis</i> sp. SAG92.79	64
Abb. 30	Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 in MLA_N -Medium und 50 % gebrauchtem Medium (GM) von <i>Synechocystis</i> sp. SAG92.79	64
Abb. 31	MC-Ausbeute von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 je Liter Kulturmedium in MLA_N -Medium und 50 % gebrauchtem Medium (GM) von <i>Synechocystis</i> sp. SAG92.79	64
Abb. 32	Trockengewicht, Gehalt an Chlorophyll-a und Microcystin-Gesamtgehalte von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31 nach einem Gefrier-Tau-Zyklus	66
Abb. 33	Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87 nach einem Gefrier-Tau-Zyklus	66
Abb. 34	(I) Flüssigchromatografische Trennung und tandemmassenspektrometrische Detektion von (1) 40 ng L-BMAA (7,29 min) und (2) 10 ng DL-2,4-DAB (7,93 min) bei $m/z = 119,1 > 88,0$ amu (BMAA) und $119,1 > 101,3$ amu (DAB) im Vergleich mit der HILIC-MS/MS-Methode (II) von Rosén & Hellenäs (2008)	68
Abb. 35	LC-MS/MS-Spektrum (Produkt-Ionen-Scan) von BMAA (a) und DAB (b) bei $m/z = 119,1$ amu	68
Abb. 36	Optimierung der MS/MS-Parameter für die Detektion von BMAA bei $m/z = 119,1 > 102,0$ amu	69
Abb. 37	Optimierung der MS/MS-Parameter für die Detektion von DAB bei $m/z = 119,1 > 101,3$ amu	69
Abb. 38	LC-MS/MS-Chromatogramm der Standardlösungen (50 ng/Injektion) von L-BMAA (links) und DL-2,4-DAB (rechts) sowie einer Probe von <i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/26 (mittig)	70
Abb. 39	HPLC-UV Bestimmung nach Lawton et al. 1994 (ISO 20179) von MC-RR / dm-MC-RR (1), MC-YR / dm-MC-YR (2), MC-LR / dm-MC-LR (3) und NOD / dm-NOD (4) in Rohextrakten von (I) <i>M. aeruginosa</i> (Senftenberger See, 2005) und (II) <i>N. spumigena</i> (Ostsee, 2004)	75
Abb. 40	(I) Chromatografische Trennung und Detektion von dm-NOD ($t_R = 10,7$ min) und NOD ($t_R = 11,6$ min) eines <i>Nodularia spumigena</i> - Rohextraktes mittels HPLC-UV ($\lambda = 238$ nm). (II) HPLC-UV-Bestimmung von dm-NOD ($t_R = 10,6$ min) und NOD ($t_R = 11,5$ min) nach 100 weiteren chromatografischen Läufen (je 30 μ l Injektionsvolumen) (III) LC-MS-Bestimmung von dm-NODs ($t_R = 11,29$ min, $t_R = 11,94$ min) und NOD ($t_R = 12,98$ min) im SIM-Modus bei m/z 811,5 und 825,5 amu). (I-III) Anwendung der HPLC-Säule Phenomenex Luna PFP (2) (250 x 4,6 mm, 5 μ m) bei isokratischer Elution (5 mM Ammoniumformiat, 53 mM Ameisensäure in 73 % H_2O / 27 % ACN, 1,0 ml min ⁻¹)	76
Abb. 41	Chromatografische Trennung von dmdm-MC-LR (1), dmdm-MC-YR (2), dmdm-MC-RR (3), MC-RR (4), dm-MC-RR (5), NOD (6), MC-YR (7), dm-MC-YR (8), MC-LR (9) und dm-MC-LR (10) eines Rohextrakts von <i>M. aeruginosa</i> aus dem Senftenberger See (2005) unter Zugabe eines NOD-Standards mittels (I) HPLC-UV und (II) LC-MS (TIC) bei Anwendung der HPLC-Säule Varian Monochrom MS	76
Abb. 42	Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine in Phytoplankton (<i>M. aeruginosa</i>) aus dem Senftenberger See (Brandenburg)	77
Abb. 43	LC-MS/MS-Produkt-Ionen-Scan (Q1 m/z 512,7 > Q3-Scan) der dm-MC-RR-Fraktion von <i>M. aeruginosa</i> aus dem Senftenberger See (2005) bei einer Kollisionsenergie von 35 V: Nachweis von [Dha ⁷]MC-RR	79
Abb. 44	LC-MS/MS-Produkt-Ionen-Scan (Q1 m/z 981 > Q3-Scan) der dm-MC-LR-Fraktion von <i>M. aeruginosa</i> aus dem Senftenberger See (2005) bei einer Kollisionsenergie von 60 V: Nachweis von [Dha ⁷]MC-LR	80
Abb. 45	LC-MS/MS-Produkt-Ionen-Scan (Q1 m/z 811,5 > Q3-Scan) der dominanten dm-NOD-Fraktion von <i>N. spumigena</i> (Ostsee, 2004) bei einer Kollisionsenergie von 35 V: Nachweis von [Asp ¹]NOD	80
Abb. 46	MS ² -Spektrum von dm-MC-RR mittels LC-MS-Ionenfalle (Bruker Daltonics Esquire HCT) bei m/z 512,7 [M+2H] ²⁺ : Nachweis von [Dha ⁷]MC-RR	81

- Abb. 47 MS²-Spektrum von dm-MC-LR mittels LC-MS-Ionenfalle (Bruker Daltonics Esquire HCT) bei m/z 981,5 $[M+H]^+$: Nachweis von $[Dha^7]MC-LR$ 81
- Abb. 48 MS²-Spektrum von dm-NOD ($t_R = 4,6$ min) mittels LC-MS-Ionenfalle (Bruker Daltonics Esquire HCT) bei m/z 811,5 $[M+H]^+$: Nachweis von $[Asp^1]NOD$ 82
- Abb. 49 MS²-Spektrum von dm-NOD ($t_R = 5,2$ min) mittels LC-MS-Ionenfalle (Bruker Daltonics Esquire HCT) bei m/z 811,5 $[M+H]^+$: Nachweis von $[Dhb^5]NOD$ 82
- Abb. 50 GC-MS-Bestimmung der derivatisierten Aminosäuren mit der chiralen Kapillarsäule Lipodex E nach Hydrolyse eines MC-LR-Standards (links) sowie der dm-MC-RR-Fraktion (rechts): Nachweis von *D-N-TFA-Ala-OMe* (11,36 min), *L-N-TFA-Leu-OMe* (14,22 min), *D-N-TFA-MeAsp(OMe)-OMe* (18,19 min), *D-N-TFA-Glu(OMe)-OMe* (20,93 min) und *L-N-TFA-Arg(N-TFA)₂-OMe* (31,19 min) in MC-LR sowie von *D-N-TFA-Ala-OMe* (11,54 min), *D-N-TFA-MeAsp(OMe)-OMe* (18,19 min), *D-N-TFA-Glu(OMe)-OMe* (20,88 min) und *L-N-TFA-Arg(N-TFA)₂-OMe* (31,32 min) in dm-MC-RR 83
- Abb. 51 GC-MS-Bestimmung eines Pyruvat-Standards sowie eines Hydrolysats der dm-MC-RR-Fraktion mit der chiralen Kapillarsäule Lipodex E nach Derivatisierung: Der Nachweis von PFBBoxim-Pyr-OTMS deutet auf das Vorkommen von Dha oder Mdha hin 84
- Abb. 52 Chromatografische Trennung von ANA (1) und Phe (2) mit den HPLC-Säulen (I) Agilent Zorbax SB-C18, (II) Supelco SupelcosilTM ABZ⁺, (III) Phenomenex Luna C18(2) und (IV) Phenomenex Luna HILIC 85
- Abb. 53 Chromatografische Trennung von ANA (1) und Phe (2) mit den HPLC-Säulen (I) Synergi[®] Polar-RP, (II) Synergi[®] Fusion-RP, (III) Luna Phenyl-Hexyl, (IV) Luna PFP und (V) Aqua (alle Phenomenex) 85
- Abb. 54 Charakteristische Massenübergänge (LC-MS/MS im MRM-Modus) für ANA (I) bei m/z 166>91, 166>107, 166>131 und 166>149 amu werden auch für Phe (II) detektiert 86
- Abb. 55 LC-MS-Bestimmung eines Rohextrakts von *Microcystis aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) und *Nodularia spumigena* (Ostsee, 2004), vermischt mit Standardlösungen von ANA, STX, CYN, NOD sowie MC-RR, -LA, -LF, -LR, -LW und -YR unter Einsatz der HPLC-Säulen (I) Luna C18(2) (II) Synergi[®] Polar-RP, (III) Synergi[®] Fusion-RP, (IV) Luna Phenyl-Hexyl, (V) Luna PFP und (VI) Aqua (alle 250 x 4,6 mm, 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) bei m/z 166,1 (ANA), 300,3 (STX), 416,4 (CYN), 505,7 ($[Asp^3,Dha^7]MC-RR$), 512,7 ($[Dha^7]MC-RR$), 519,7 (MC-RR), 825,5 (NOD), 910,5 (MC-LA), 967,5 ($[Asp^3,Dha^7]MC-LR$), 981,5 ($[Dha^7]MC-LR$), 986,5 (MC-LF), 995,5 (MC-LR), 1025,5 (MC-LW) und 1045,5 (MC-YR). 88
- Abb. 56 LC-MS-Bestimmung eines Multitoxingemisches unter Einsatz der HPLC-Säulen (I) Aqua und (II) Synergi[®] Polar-RP und einer mobilen Phase bestehend aus 0,75 mM TDFHA und 0,375 mM NH₃ in H₂O / ACN. Detektion bei m/z 166,1 (ANA), 300,3 (STX), 416,4 (CYN), 505,7 ($[Asp^3,Dha^7]MC-RR$), 512,7 ($[Dha^7]MC-RR$), 519,7 (MC-RR), 825,5 (NOD), 910,5 (MC-LA), 967,5 ($[Asp^3,Dha^7]MC-LR$), 981,5 ($[Dha^7]MC-LR$), 986,5 (MC-LF), 995,5 (MC-LR), 1025,5 (MC-LW) und 1045,5 (MC-YR). 90
- Abb. 57 LC-MS-Bestimmung von ANA und Phe bei m/z 166,1 mittels der HPLC-Säulen (I) Aqua und (II) Synergi[®] Polar-RP und einer mobilen Phase bestehend aus 0,75 mM TDFHA und 0,375 mM NH₃ in H₂O / ACN 90
- Abb. 58 LC-MS-Bestimmung von PSP-Toxinen bei m/z 257 (dcSTX), 300 (STX), 316 (NEO), 332 (GTK1/4, $[M+H-SO_3]^+$), 353 (dcGTK2/3), 396 (GTK2/3) und 412 (GTK1/4, $[M+H]^+$) mittels der HPLC-Säulen (I) Aqua und (II) Synergi[®] Polar-RP und einer mobilen Phase bestehend aus 0,75 mM TDFHA und 0,375 mM NH₃ in H₂O / ACN 91

III Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1 Übersicht der bisher beschriebenen Microcystinvarianten	3-4
Tab. 2 Übersicht der bisher beschriebenen Nodularinvarianten	7
Tab. 3 Übersicht der bisher beschriebenen Cylindrospermopsine	8
Tab. 4 Übersicht der bisher beschriebenen Strukturanaloga und Derivate von Anatoxin-a	10
Tab. 5 Wissenschaftliche Kontroverse über das Vorkommen von BMAA in Cyanobakterien	17-18
Tab. 6 Übersicht der bisher beschriebenen PSP-Toxine	20
Tab. 7 Toxingehalte von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis	28
Tab. 8 Routineanalytik von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis im Hinblick auf cyanobakterielle Toxine (1998-2009)	29
Tab. 9 Nährstoffzusammensetzung der verwendeten Kulturmedien	40
Tab. 10 Überblick des experimentellen Aufbaus und der modifizierten Kultivierungsbedingungen	45
Tab. 11 Optimierung der mobilen Phase zur chromatografischen Trennung von BMAA und DAB	47
Tab. 12 Durchschnittliche Wiederfindungsrate von BMAA und DAB nach Extraktion und Hydrolyse	70
Tab. 13 Gesamtgehalte an freiem und proteingebundenem BMAA und DAB in freilebenden Cyanobakterien und ausgewählten Pflanzensamen	71
Tab. 14 Gesamtgehalte an freiem und proteingebundenem BMAA und DAB in Nahrungsergänzungsmitteln auf Basis von Cyanobakterien und anderen Mikroalgen	71
Tab. 15 LC-MS-Bestimmung der Microcystingehalte unterschiedlicher Phytoplanktonproben in $\mu\text{g g}^{-1}$ Trockenmasse bzw. $\mu\text{g l}^{-1}$ Wasser *	77
Tab. 16 Vergleich der Peakintensitäten (cps) der MS/MS-Fragmente von 5 ng ANA und 50 ng Phe bei variablen Kollisionsenergien (CE), *Relation der Peakintensitäten (ANA/Phe bzw. Phe/ANA) > 95 %, ** Kontrollparameter	87
Tab. 17 Vergleich der Peakintensitäten (cps) der MS/MS-Fragmente von 5 ng ANA und 50 ng Phe bei variablen Kollisionszellen-Austrittspotenzialen (CXP) und Ionisierungsspannungen (IS), *Relation der Peakintensitäten (ANA/Phe bzw. Phe/ANA) > 95 %, ** Kontrollparameter	87
Tab. 18 Vergleich der Nachweisgrenzen (ng je Injektion) für cyanobakterielle Toxine im Rahmen der Multikomponentenmethoden unter Einsatz der HPLC-Säulen Phenomenex Aqua und Polar-RP mit und ohne Verwendung von TDFHA	91
Anhang	
Tab. 19 Nitrat-Experiment: Trockengewichte von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	130-131
Tab. 20 Nitrat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	131-132
Tab. 21 Nitrat-Experiment: Microcystingehalte ($\mu\text{g g}^{-1}$) von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	132-133
Tab. 22 Nitrat-Experiment: Trockengewichte von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	133-135
Tab. 23 Nitrat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	135-136
Tab. 24 Phosphat-Experiment: Trockengewichte von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	136-137
Tab. 25 Phosphat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	137-138
Tab. 26 Phosphat-Experiment: Microcystingehalte ($\mu\text{g g}^{-1}$) von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	138
Tab. 27 Phosphat-Experiment: Trockengewichte von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	139
Tab. 28 Phosphat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	139-140
Tab. 29 pH-Experiment: Trockengewichte von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	140-141
Tab. 30 pH-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	141-142
Tab. 31 pH-Experiment: Microcystingehalte ($\mu\text{g g}^{-1}$) von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	142
Tab. 32 pH-Experiment: Trockengewichte von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	142-143
Tab. 33 pH-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	143-144
Tab. 34 pH-Experiment: Anatoxin-a-Gehalte von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	144

Tab. 35	GM-Experiment: Trockengewichte von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	144
Tab. 36	GM-Experiment: Gehalt an Chlorophyll- <i>a</i> von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	145
Tab. 37	GM-Experiment: Microcystingehalte ($\mu\text{g g}^{-1}$) von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	145
Tab. 38	GM-Experiment: Trockengewichte von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	145-146
Tab. 39	GM-Experiment: Gehalt an Chlorophyll- <i>a</i> von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	146
Tab. 40	Kryo-Experiment: Trockengewichte von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	146
Tab. 41	Kryo-Experiment: Gehalt an Chlorophyll- <i>a</i> von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	147
Tab. 42	Kryo-Experiment: Trockengewichte von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	147
Tab. 43	Kryo-Experiment: Gehalt an Chlorophyll- <i>a</i> von <i>A. flos-aquae</i> SAG30.87	147
Tab. 44	Ausbeute an Microcystinen (μg) je Liter Kulturmedium von <i>M. aeruginosa</i> AB2005/31	147

IV Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin (Einbuchstabencode)
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i> (Transporter)
Abu	2-Amino- <i>N</i> -Buttersäure
ACN	Acetonitril
Adda	3-Amino-9-Methoxy-2,6,8-Trimethyl-10-Phenyldeca-4,6-Diensäure
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom
ADMAdda	9-O-Acetyl-O-Desmethyl-Adda
Ad-S-CH ₃	<i>S</i> -Adenosylmethionin
AFA	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
Aib	2-Amino-Isobuttersäure
Ala	Alanin
ALS-PDC	Amyotrophe Lateralsklerosis-Parkinson-Demenz-Komplex
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
amu	<i>atomic mass units</i> , entspricht Dalton (Da)
Ana.	<i>Anabaena</i>
ANA	Anatoxin-a
ANAS	Anatoxin-a(s)
AOAC	Vereinigung der offiziellen analytischen Chemiker, <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
<i>Aph.</i>	<i>Aphanizomenon</i>
API	Atmosphärendruck-Iononisierung, <i>atmospheric-pressure ionisation</i>
AQC	6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate
Arg	Arginin
ASM-1	Flüssigkulturmedium, <i>artificial seawater medium</i>
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG11	Flüssigkulturmedium, <i>blue-green algae medium</i>
BgVV	ehemaliges Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BMAA	β - <i>N</i> -Methylamino- <i>L</i> -Alanin
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BOAA	β - <i>N</i> -Oxylamino- <i>L</i> -Alanin = ODAP
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Cylindrospermopsis</i>
CAD	Kollisions-aktiviertes Dissoziationsgas, <i>collisionally-activated dissociation gas</i>
CarboxylANA	11-Carboxylanatoxin-a
CE	Kollisionsenergie, <i>collision energy</i>
cps	<i>counts per second</i> , Maß der Peakintensität in der Massenspektrometrie
CUR	Schutzgas, <i>curtain gas</i>
CXP	Kollisionszellen-Austrittspotenzial, <i>collision cell exit potential</i>
CYN	<i>Cylindrospermopsin</i>
Cys	Cystein
Da	Dalton

DAB	2,4-Diaminobuttersäure
Dansyl-Cl	1-Dimethylaminonaphthalen-5 sulfonylechlorid
dcGTX	Decarbamoylgonyautoxin
dcNEO	Decarbamoylneosaxitoxin
dcSTX	Decarbamoylsaxitoxin
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
Dha	2-Dehydroalanin
Dhb	2-Amino-2-Butensäure, 2-Dehydrobutyrine
DihydroANA	2,3-Dihydroanatoxin
DihydroHANA	2,3-Dihydrohomoanatoxin
DihydromethoxyHANA	2,3-Dihydromethoxyhomoanatoxin
DMAdda	9-O-Desmethyl-Adda
dmdm-MC	Didesmethyl-Microcystin
dm-MC	Desmethyl-Microcystin
dm-NOD	Desmethyl-Nodularin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DoCYN	7-Deoxycylindropsermopsin
doGTX	Deoxydecarbamoylgonyautoxin
doSTX	Deoxydecarbamoylsaxitoxin
DP	<i>Declustering Potential</i>
E	Glutaminsäure (Einbuchstabencode)
ECD	Elektroneneinfang-Detektor, <i>electron capture detector</i>
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, <i>European Food Safety Authority</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i>
EP	Eintrittspotenzial, <i>entrance potential</i>
EpiCYN	7-Epicylindrospermopsin
EpoxyANA	2,3-Epoxyanatoxin
EpoxyHANA	2,3-Epoxyhomoanatoxin
ESI	Elektrosprayionisierung, <i>electro spray ionisation</i>
<i>et al.</i>	und andere, (lat.) <i>et alii</i> (Maskulinum), <i>et aliae</i> (Femininum), <i>et alia</i> (Neutrum)
EU	Europäische Union
F	Phenylalanin (Einbuchstabencode)
<i>f.-a.</i>	<i>flos-aquae</i>
FischHV	Verordnung über die hygienischen Anforderungen an Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln, Fischhygiene-Verordnung
FLD	Fluoreszenzdetektion
FMOC	9-Fluorenylmethylchloroformat
FP	Fokussierpotenzial, <i>focussing potential</i>
g	Angabe der Beschleunigung einer Zentrifuge als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Gaschromatografie
GC1-3	<i>Gymnodinium catenatum</i> -Toxine
Glu	Glutaminsäure
GluX	Glutaminsäure-OC ₂ H ₃ (CH ₃)OH
GM	gebrauchtes Medium von <i>Synechocystis sp.</i> SAG 92.79

GM _{Exp}	Experiment mit gebrauchtem Medium von <i>Synechocystis</i> sp. SAG 92.79
GSH	Glutathion
GTX	Gonyautoxin
h	Stunde(n)
HANA	Homoanatoxin-a
Har	Homoarginin
HFBA	Heptafluorbuttersäure, <i>heptafluorobutyric acid</i>
Hil	Homoisoleucin
HILIC	Hydrophile Interaktionsflüssigchromatografie, <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
Hph	Homophenylalanin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie, <i>high performance liquid chromatography</i>
Hty	Homotyrosin
HydroxyANA	4-Hydroxyanatoxin-a
HydroxyHANA	4-Hydroxyhomoanatoxin-a
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration mit halbmaximaler Enzymhemmung
i.p.	intraperitoneal
IS	Ionisierungsspannung, <i>ion spray voltage</i>
ISO	Internationale Organisation für Normierung, <i>International Organization for Standardization</i>
k.A.	keine Angaben
KbE	koloniebildende Einheiten
KetoHANA	4-Ketohomoanatoxin
KG	Körpergewicht
Kryp.	Kryopreservation, Gefrierkonservierung
L	Leucin (Einbuchstabencode)
<i>L.</i>	<i>Lyngbya</i>
λ	Lambda, Wellenlänge des Absorptionsmaximums
λ_{Em}	Emissionswellenlänge fluoreszierender Substanzen
λ_{Ex}	Exzitations- bzw. Anregungswellenlänge fluoreszierender Substanzen
LC ₅₀	Letale Konzentration, bei der 50% der Versuchstiere sterben
LC-MS	Kopplung von Flüssigchromatografie und Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Kopplung von Flüssigchromatografie und Tandemmassenspektrometrie
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
Leu	Leucin
LOD	Nachweisgrenze, <i>limit of detection</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LWTX	<i>Lyngbya wollei</i> - Toxin
<i>M.</i>	<i>Microcystis</i>
<i>M. aerug.</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
MCs	Microcystine
<i>mcy</i>	Microcystinsynthetase-Gencluster
MeDap	α -Amino- β -Methylaminopropionsäure = BMAA
Mdha	2-Methylamino-2-Dehydroalanin
Mdhb	2-Methylamino-2-Butensäure, 2-Methyl-Dehydrobutyrine
MeAbu	<i>N</i> -Methyl-Aminobuttersäure
MeAla	Methylalanin
MeAsp	<i>D-erythro-β</i> -Methylasparaginsäure

MeGlu	Glutaminsäuremethylester
MeLan	Methylanthonin
MeSer	<i>N</i> -Methylserin
MetO	Methionin- <i>S</i> -oxid
MLA	Flüssigkulturmedium
M(O)	Methionin- <i>S</i> -oxid
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie, <i>mass spectrometry</i>
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -Trimethylsilyl-Trifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
<i>N.</i>	<i>Nodularia</i>
N0-5	Nitrat-N-Gehalte der Stufen 0-5
n.a.	nicht analysiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBD-F	4-Fluoro-7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol
n.d.	nicht detektierbar
<i>nda</i>	Nodularinsynthetase-Gencluster
NEB	Verneblungsgas, <i>nebulizer gas</i>
NEO	Neosaxitoxin
N _{Exp}	Nitrat-Experiment
NMDA	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
NODs	Nodularine
Nr.	Nummer
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetasen
N-TFA-Aminosäure-OMe	<i>N</i> -Trifluoracetyl-Aminosäure- <i>O</i> -Methylester
Ø	Mittelwert
ODA	<i>Oregon Department of Agriculture</i>
ODAP	β-Oxalyl- <i>L</i> -α,β-Diaminopropionsäure
o.g.	oben genannt
OHD	<i>Oregon Health Division</i>
OPA	<i>o</i> -Pthaldialdehyd
<i>Osc.</i>	<i>Oscillatoria</i>
<i>P.</i>	<i>Planktothrix</i>
P1-4	Phosphat-P-Gehalte der Stufen 1-4
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
P _{Exp}	Phosphat-Experiment
PFB-O-NH ₂	Pentafluorbenzylhydroxylamin
PFBxim-Ketosäure-OTMS	Pentafluorbenzyloxim-Ketosäure-Trimethylsilylester
Phe	Phenylalanin
pH _{Exp}	pH-Experiment
PIS	Produkt-Ionen-Scan, <i>product ion scan</i>
PITC	Phenylisothiocyanat
PKS	Polyketidsynthasen
PP	Proteinphosphatasen
PPIA	<i>protein phosphatase inhibition assay</i> , Proteinphosphatase-Hemmtest
PSP	<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>
Pyr	Pyruvat

Q0	Quadrupol 0, Ionenfokussierung
Q1	Quadrupol 1, Massenanalysator
Q2	Quadrupol 2, Kollisionszelle
Q3	Quadrupol 3, Massenanalysator
R	Arginin (Einbuchstabencode)
R-	Rest
<i>Raph.</i>	<i>Raphidiopsis</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase, <i>reversed phase</i>
S	Serin (Einbuchstabencode)
<i>S</i>	Standardabweichung
SAG	Sammlung von Algenkulturen Göttingen
Ser	Serin
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis, <i>signal to noise</i>
<i>sp.</i>	Spezies, <i>specie</i>
SPE	Festphasenextraktion, <i>solid phase extraction</i>
<i>spp.</i>	mehrere Spezies, <i>species pluralis</i>
STX	Saxitoxin
SCX	starker Kationenaustauscher, <i>strong cation exchanger</i>
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TDFHA	Tridecafluorheptansäure
TDI	tolerierbare Tagesdosis, <i>tolerable daily intake</i>
TFA	Trifluoressigsäure, <i>trifluoroacetic acid</i>
ThTyr	Tetrahydrotyrosin
TIC	Totalionenchromatogramm, <i>total ion current plot</i>
TIS	Turbo-Ionenspray, <i>turbo ion spray</i>
TOF	Flugzeit-Massenanalysator, <i>time of flight</i>
<i>t_R</i>	Retentionszeit
TrinkwV	Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch, Trinkwasser-Verordnung
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem, unter anderen
UK	<i>United Kingdom</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
V	Valin (Einbuchstabencode)
v.a.	vor allem
Val	Valin
v/v	Volumenanteile
W	Tryptophan (Einbuchstabencode)
WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>World Health Organisation</i>
Y	Tyrosin (Einbuchstabencode)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Cyanobakterien (*Cyanophyta*, Blaualgen) besiedeln seit mehr als 3,5 Milliarden Jahren, auch unter klimatisch extremen Bedingungen, nahezu alle Ökosysteme der Erde (Schopf 1996). Durch die Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese haben diese ältesten Lebensformen entscheidend zur Sauerstoffanreicherung der Erdatmosphäre beigetragen (Lehtimäki 2000). Im Kontext der Endosymbiontentheorie entwickelten sich die für die Photosynthese der Grünalgen und höheren Pflanzen notwendigen Chloroplasten aus endosymbiotischen Cyanobakterien. Die Klasse der *Cyanophyta* umfasst etwa 150 Gattungen und mehr als 2000 Spezies, die taxonomisch in 5 Sektionen¹ eingeteilt (Rippka et al. 1979) und der Domäne der Eubakterien zugeordnet werden (Duy et al. 2000). Die Biosynthese cyanobakterieller Toxine unterliegt einer großen Variabilität und kann mindestens 40 Gattungen zugeschrieben werden, wobei die bedeutendsten *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* und *Oscillatoria* (*Planktothrix*) sind (Carmichael 2001). Massenvorkommen von Cyanobakterien lassen sich anhand von Sedimentkernuntersuchungen des Meeresbodens bis in das Altertum zurückverfolgen (McGowan et al. 1999). Auch dokumentiert die Bibel in der ersten der zehn Plagen möglicherweise das Phänomen einer cyanobakteriellen Blüte von *Planktothrix rubescens*, der sogenannten Burgunderblutalge: „Da wurde alles Wasser, das im Strome war, in Blut verwandelt; und die Fische, die im Strome waren, starben, und der Strom wurde stinkend, und die Aegypter konnten das Wasser aus dem Strome nicht trinken; und das Blut war im ganzen Lande Aegypten.“ (2. Buch Mose, 7, 20-21).

Cyanobakterien erhalten ihre charakteristische blaugrüne und zuweilen rote Färbung durch Chlorophyll-*a* sowie die akzessorischen Pigmente (Phycobilline) Phycocyanin und Phycoerythrin (Fritsche 2002). Massenvorkommen von Cyanobakterien werden durch hohe Temperaturen, Eutrophierung, alkalische Milieus (pH 8-10) und stehende Gewässer begünstigt und gehen ferner mit einer intensiven Geruchsentwicklung („*off flavor*“) einher, die u.a. durch die Produktion von Geosmin (*Trans*-1,10-Dimethyl-*trans*-9-decalol) und 2-Methylisoborneol hervorgerufen wird (Weller 2002).

¹ *Sektion 1*: unizellulär, Reproduktion durch Fusion oder Knospung, *Sektion 2*: unizellulär, Reproduktion durch multiple Teilung, *Sektion 3*: filamentös nicht-heterozystisch, in einer Ebene teilend, *Sektion 4*: filamentös, heterozystisch, in einer Ebene teilend, *Sektion 5*: filamentös, heterozystisch, in mehreren Ebenen teilend.

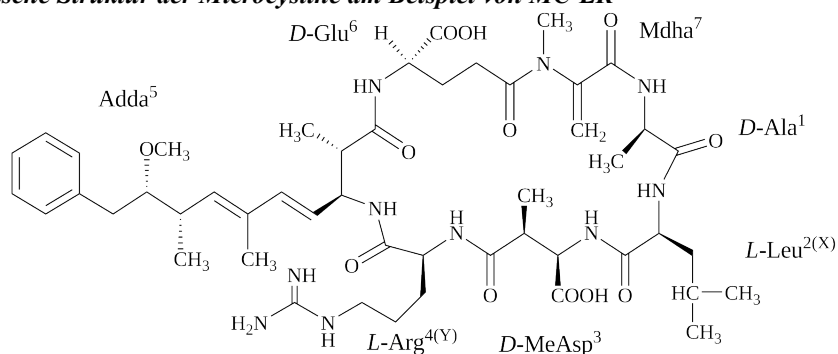
2 Chemische Struktur, Toxizität und Vorkommen cyanobakterieller Toxine

2.1 Hepatotoxine

2.1.1 Microcystine

Strukturell sind Microcystine (MCs) zyklische Heptapeptide mit einem Molekulargewicht zwischen 895 und 1114 g mol⁻¹ und einer allgemeinen Aminosäuresequenz von (1) *D*-Alanin (Ala, A), (2) einer variablen Aminosäure (X), (3) *D*-erythro- β -Methylasparaginsäure (MeAsp), (4) einer weiteren variablen Aminosäure (Y), (5) 3-Amino-9-Methoxy-2,6,8-Trimethyl-10-Phenyldeca-4,6-Diensäure (Adda), (6) *D*-Glutaminsäure (Glu, E) und (7) 2-Methylamino-2-Dehydroalanin (Mdha). Die Nomenklatur der MCs wird maßgeblich durch den 1-Buchstabencode der variablen Aminosäuren der Positionen 2(X) und 4(Y) determiniert (Carmichael et al. 1988a). Insofern nichtproteinogene Aminosäuren vorliegen, charakterisieren 3-Buchstabencodes oder spezifische Kurzschreibweisen die variablen Aminosäuren im Molekül. Exemplarisch exponiert MC-LR (Abb. 1) das Vorkommen von *L*-Leucin (Leu, L) und *L*-Arginin (Arg, R) an den Positionen 2(X) bzw. 4(Y).

Abb. 1 Chemische Struktur der Microcystine am Beispiel von MC-LR



Indes kommen Strukturvariationen an allen 7 Aminosäuren vor. Die Substitution der entsprechenden Aminosäure und ihre numerische Position im Molekül werden in einem Präfix in eckigen Klammern charakterisiert. Beispielsweise bezeichnet [Asp³, Dha⁷] MC-LR Desmethylierungen an den Positionen 3 und 7. Auch wurden Substitutionen an Position 1 durch *D*-Leucin oder *D*-Serin, Adda-Variationen 9-*O*-Acetyl-*O*-Desmethyl-Adda (ADMAdda) und 9-*O*-Desmethyl-Adda (DMAdda) an Position 5, Veresterungen der Glutaminsäure an Position 6 sowie Substitutionen an Position 7 durch Dehydroalanin (Dha), *N*-Methylserin (MeSer), Methylanthionin (MeLan), Serin (Ser, S), 2-Amino-2-Butensäure (Dehydrobutyrine, Dhb) oder Pyruvat (Pyr, Ketosäure verursacht Ringspaltung) beschrieben. Die mannigfaltige Variabilität der MCs äußert sich in 91 bisher beschriebenen Strukturvarianten (Tab. 1).

Tab. 1 Übersicht der bisher beschriebenen Microcystinvarianten

Nr.	MC-Variante	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	Aminosäuresequenz							LD50 µg/kg	Vorkommen (Literatur)
				1	2(X)	3	4(Y)	5	6	7		
1	[D-Asp ³]MC-LA	896,5	448,8	Ala	Leu	Asp	Ala	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Diehnelt et al. 2006)
2	MC-LA	910,5	455,8	Ala	Leu	MeAsp	Ala	Adda	Glu	Mdha	50	<i>M. aerug.</i> (Botes et al. 1984), <i>M. virides</i> (Kaya & Watanabe 1990)
3	[D-Asp ³]MC-LL	938,5	469,8	Ala	Leu	Asp	Leu	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Diehnelt et al. 2006)
4	MC-LAib	924,5	462,3	Ala	Leu	MeAsp	Aib	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Gathercole & Thiel 1987)
5	MC-LAbu	924,5	462,3	Ala	Leu	MeAsp	Abu	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Mahakhan et al. 1998)
6	MC-LL	952,5	476,8	Ala	Leu	MeAsp	Leu	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Craig et al. 1993)
7	MC-AR	953,5	477,3	Ala	Ala	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	250	<i>Microcystis</i> spp. (Namikoshi et al. 1992a)
8	MC-RA	953,5	477,3	Ala	Arg	MeAsp	Ala	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Lee et al. 1998)
9	MC-YA	960,5	480,7	Ala	Tyr	MeAsp	Ala	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Botes et al. 1985)
10	[D-Asp ³ ,Dha ⁷]MC-LR	967,5	484,3	Ala	Leu	Asp	Arg	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Harada et al. 1991a), <i>Ana. sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
11	[D-Asp ³ ,Dha ⁷]MC-EE(OMe)	970,4	485,7	Ala	Glu	Asp	MeGlu	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Namikoshi et al. 1998)
12	MC-VF	972,5	486,8	Ala	Val	MeAsp	Phe	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Bateman et al. 1995)
13	[D-Asp ³]MC-LF	972,5	486,8	Ala	Leu	Asp	Phe	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Bateman et al. 1995)
14	[D-Asp ³ , (Z)-Dhb ⁷]MC-LR	981,5	491,3	Ala	Leu	Asp	Arg	Adda	Glu	Dhb	k.A.	<i>Osc. agardhii</i> (Sano et al. 1998)
15	[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-LR	981,5	491,3	Ala	Leu	Asp	Arg	Adda	Glu	Dhb	70	<i>Osc. agardhii</i> (Sano & Kaya 1998)
16	[D-Asp ³]MC-LR	981,5	491,3	Ala	Leu	Asp	Arg	Adda	Glu	Mdha	160-300	<i>M. aerug.</i> (Krishnamurthy et al. 1989, Cremer & Henning 1991)
17	[Dha ⁷]MC-LR	981,5	491,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Dha	250	<i>Ana. f.-a.</i> (Sivonen et al. 1992b) <i>M. viridis</i> (Harada et al. 1990)
18	[DMAdda ⁵]MC-LR	981,5	491,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	DMAdda	Glu	Mdha	95	<i>Osc. agardhii</i> (Luukkainen et al. 1993) <i>M. aerug.</i> (Harada et al. 1991a), <i>Ana. sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
19	MC-AW	983,5	492,3	Ala	Ala	MeAsp	Trp	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>Osc. agardhii</i> (Luukkainen et al. 1993)
20	[D-Asp ³ ,Dha ⁷]MC-E(OMe)E(OMe)	984,5	492,7	Ala	MeGlu	Asp	MeGlu	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Microcystis</i> spp. (Namikoshi et al. 1992a)
21	[Dha ⁷]MC-EE(OMe)	984,5	492,7	Ala	Glu	MeAsp	MeGlu	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Nostoc</i> sp. (Sivonen et al. 1992c)
22	MC-LF	986,5	493,8	Ala	Leu	MeAsp	Phe	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Kaya et al. 2000)
23	[(6Z)Adda ⁵]-MC-LR	995,6	498,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	(6Z)Adda	Glu	Mdha	>1200	<i>Ana. sp.</i> (Namikoshi et al. 1998)
24	[D-Asp ³ ,Glu(OMe) ⁶]MC-LR	995,6	498,3	Ala	Leu	Asp	Arg	Adda	MeGlu	Mdha	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Namikoshi et al. 1998)
25	[Dha ⁷]MC-HiLR	995,6	498,3	Ala	Hil	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Namikoshi et al. 1998)
26	[D-Asp ³ ,Dhb ⁷]MC-HiLR	995,6	498,3	Ala	Hil	Asp	Arg	Adda	Glu	Dhb	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Namikoshi et al. 1998)
27	MC-LR	995,6	498,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	50	<i>M. aerug.</i> (Azevedo et al. 1994) <i>M. viridis</i> (Harada et al. 1990), <i>M. aerug.</i> (Devries et al. 1993)
28	[D-Asp ³]MC-LHar	995,6	498,3	Ala	Leu	Asp	Har	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Sivonen et al. 1992d)
29	[D-MeAla ⁷]MC-LR	997,6	499,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	D- MeAla	100	<i>M. aerug.</i> (Sano et al. 2008) <i>Osc. rubescens</i> (Sano et al. 2004)
30	[L-MeAla ⁷]MC-LR	997,6	499,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	L- MeAla	85	<i>M. aerug.</i> (Botes et al. 1985, Rinehart et al. 1988), <i>Ana. f.-a.</i> (Sivonen et al. 1992b), <i>M. viridis</i> (Watanabe et al. 1988)
31	[Dha ⁷]MC-E(OMe)E(OMe)	998,5	499,7	Ala	MeGlu	MeAsp	MeGlu	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
32	[L-Ser ⁷]MC-LR	999,6	500,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Ser	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
33	[D-Asp ³ ,Ser ⁷]MC-E(OMe)E(OMe)	1002,5	501,7	Ala	MeGlu	Asp	MeGlu	Adda	Glu	Ser	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
34	[L-Ser ⁷]MC-EE(OMe)	1002,5	501,7	Ala	Glu	MeAsp	MeGlu	Adda	Glu	L-Ser	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
35	MC-LY	1002,5	501,8	Ala	Leu	MeAsp	Tyr	Adda	Glu	Mdha	90	<i>Ana. sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
36	[D-Asp ³ ,ADMAAdda ⁵ ,Dhb ⁷]MC-LR	1009,5	505,3	Ala	Leu	Asp	Arg	ADMAAdda	Glu	Dhb	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Stoner et al. 1989)
37	[D-Asp ³ ,ADMAAdda ⁵]MC-LR	1009,5	505,3	Ala	Leu	Asp	Arg	ADMAAdda	Glu	Mdha	160	<i>Nostoc</i> sp. (Beattie et al. 1998)
38	[D-Glu(OMe) ⁶]MC-LR	1009,6	505,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	MeGlu	Mdha	>1000	<i>Nostoc</i> sp. (Namikoshi et al. 1990)
39	MC-HiLR	1009,6	505,3	Ala	Hil	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	100	<i>Ana. flos-aquae</i> (Sivonen et al. 1992b)
40	MC-LHar	1009,6	505,3	Ala	Leu	MeAsp	Har	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Sivonen et al. 1992d, Rinehart et al. 1994, Bateman et al. 1995)
41	[MeAla ⁷]MC-LR oder MC-MeLR	1009,6	505,3	Ala / MeAla	Leu / MeLeu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>Microcystis</i> spp. (Namikoshi et al. 1992a)
42	[D-Asp ³ ,Dha ⁷]MC-RR	1010,5	505,8	Ala	Arg	Asp	Arg	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Osc. tenuis</i> (Brittain et al. 2000)
43	Desmethyl-MC-LW	1011,5	506,3	Ala	Leu	Asp / MeAsp	Trp	Adda / DMAdda	Glu	Dha / Mdha / Dhb	k.A.	nicht spezifizierte Cyanobakterien-Blüte im Lake Suwa 2005 (Mayumi et al. 2006)
44	[L-MeSer ⁷]MC-LR	1013,6	507,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	MeSer	150	<i>Ana. sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
45	[D-Asp ³]MC-FR	1015,5	508,3	Ala	Phe	Asp	Arg	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>Osc. agardhii</i> (Meriluoto et al. 1989)
46	[Dha ⁷]MC-FR	1015,5	508,3	Ala	Phe	Asp	Arg	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Luukkainen et al. 1994)
47	[Ser ⁷]MC-E(OMe)E(OMe)	1016,5	508,7	Ala	MeGlu	MeAsp	MeGlu	Adda	Glu	Ser	k.A.	<i>Osc. agardhii</i> (Sano & Kaya 1995)
48	MC-YM	1020,5	510,7	Ala	Tyr	MeAsp	Met	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>P. rubescens</i> (Blom et al. 2001)
49	[ADMAAdda ⁵]MC-LR	1023,5	512,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	ADMAAdda	Glu	Mdha	60	<i>Anabaena</i> spp. (Sivonen et al. 1992a)
50	[D-Asp ³ ,ADMAAdda ⁵]MC-LHar	1023,6	512,3	Ala	Leu	Asp	Har	ADMAAdda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Kiviranta et al. 1992)
51	[D-Asp ³]MC-RR	1024,6	512,8	Ala	Arg	Asp	Arg	Adda	Glu	Mdha	250	<i>Osc. agardhii</i> (Luukkainen et al. 1993)
52	[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-RR	1024,6	512,8	Ala	Arg	Asp	Arg	Adda	Glu	Dhb	250	<i>M. aerug.</i> (Bateman et al. 1995)
53	[Dha ⁷]MC-RR	1024,6	512,8	Ala	Arg	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Dha	180	<i>Anabaena</i> spp. (Sivonen et al. 1992a)
54	MC-LW	1025,5	513,3	Ala	Leu	MeAsp	Trp	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Kiviranta et al. 1992)
55	[Dha ⁷]MC-HphR	1029,5	515,3	Ala	Hph	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Osc. agardhii</i> (Luukkainen et al. 1993)
56	MC-FR	1029,5	515,3	Ala	Phe	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	250	<i>M. aerug.</i> (Bateman et al. 1995)
57	MC-M(O)R	1029,5	515,3	Ala	MetO	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	750	<i>Anabaena</i> spp. (Sivonen et al. 1992a)
58	[D-Asp ³ ,Dha ⁷]MC-HtyR	1031,5	516,3	Ala	Hty	Asp	Arg	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Microcystis</i> spp. (Namikoshi et al. 1992a)
59	[D-Asp ³]MC-YR	1031,5	516,3	Ala	Tyr	Asp	Arg	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>Anabaena</i> spp. (Sivonen et al. 1992a)
60	[D-Asp ³ ,Dhb ⁷]MC-YR	1031,5	516,3	Ala	Tyr	Asp	Arg	Adda	Glu	Dhb	k.A.	<i>M. spp.</i> (Namikoshi et al. 1992d)
61	[Dha ⁷]MC-YR	1031,5	516,3	Ala	Tyr	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Plankthothrix</i> sp. (Keil et al. 2002)
62	[Dha ⁷]MC-ThTyrR	1035,6	518,3	Ala	ThTyr	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Sivonen et al. 1992d)
63	MC-YM(O)	1036,5	518,7	Ala	Tyr	MeAsp	MetO	Adda	Glu	Mdha	56	<i>M. aerug.</i> (Sano et al. 2008)
64	[D-Leu ¹]MC-LR	1037,5	519,3	D-Leu	Leu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>M. aerug.</i> (Elleman et al. 1978, Botes et al. 1985)
65	[ADMAAdda ⁵]MC-LHar	1037,6	519,3	Ala	Leu	MeAsp	Har	ADMAAdda	Glu	Mdha	60	<i>M. aerug.</i> (Matthiensen et al. 2000)

Fortsetzung Tab. 1 Übersicht der bisher beschriebenen Microcystinvarianten

Nr.	MC-Variante	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	Aminosäuresequenz							LD50 µg/kg	Vorkommen (Literatur)
				1	2(X)	3	4(Y)	5	6	7		
66	[(6Z)Adda ⁵]MC-RR	1038,6	519,8	Ala	Arg	MeAsp	Arg	(6Z)Adda	Glu	Mdha	>1200	<i>M. viridis</i> (Harada et al. 1990)
67	MC-RR	1038,6	519,8	Ala	Arg	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	600	<i>M. aerug.</i> (Watanabe et al. 1988), <i>M. viridis</i> (Kusumi et al. 1987), <i>Anabaena sp.</i> (Sivonen et al. 1992a)
68	[D-Asp ³ ,D-Glu(OMe) ⁶]MC-RR	1038,6	519,8	Ala	Arg	Asp	Arg	Adda	MeGlu	Mdha	k.A.	<i>P. rubescens</i> (Grach-Pogrebinsky et al. 2004)
69	[D-Ser ¹ ,ADMAdda ⁵]MC-LR	1039,5	520,3	D-Ser	Leu	MeAsp	Arg	ADMAdda	Glu	Mdha	k.A.	<i>Nostoc sp.</i> (Sivonen et al. 1992c)
70	[ADMAdda ⁵ ,MeSer ⁷]MC-LR	1041,6	521,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	ADMAdda	Glu	MeSer	k.A.	<i>Nostoc sp.</i> (Sivonen et al. 1992c)
71	[D-Asp ³ ,MeSer ⁷]MC-RR	1042,6	521,8	Ala	Arg	Asp	Arg	Adda	Glu	MeSer	k.A.	<i>P. agardhii</i> (Luukkainen et al. 1993)
72	[L-Ser ⁷]MC-RR	1042,6	521,8	Ala	Arg	MeAsp	Arg	Adda	Glu	L-Ser	k.A.	<i>Ana. sp.</i> (Namikoshi et al. 1992b)
73	<i>seco</i> [D-Asp ³]MC-RR	1042,6	521,8	Ala	Arg	Asp	Arg	Adda	MeGln	Pyr	k.A.	<i>P. rubescens</i> (Grach-Pogrebinsky et al. 2004)
74	[D-Asp ³]MC-HtyR	1045,5	523,3	Ala	Hty	Asp	Arg	Adda	Glu	Mdha	160-300	<i>Ana. flos-aquae</i> (Harada et al. 1991b)
75	[D-Asp ³ , (Z)-Dhb ⁷]MC-HtyR	1045,5	523,3	Ala	Hty	Asp	Arg	Adda	Glu	Dhb	k.A.	<i>Osc. agardhii</i> (Sano et al. 1998)
76	[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-HtyR	1045,5	523,3	Ala	Hty	Asp	Arg	Adda	Glu	Dhb	70	<i>Osc. agardhii</i> (Sano & Kaya 1998)
77	[Dha ⁷]MC-HtyR	1045,5	523,3	Ala	Hty	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Dha	k.A.	<i>Anabaena sp.</i> (Namikoshi et al. 1992c)
78	MC-YR	1045,5	523,3	Ala	Tyr	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	70	<i>M. aerug.</i> (Botes et al. 1984)
79	[L-Ser ⁷]MC-YR	1049,5	525,3	Ala	Tyr	MeAsp	Arg	Adda	Glu	L-Ser	k.A.	<i>M. viridis</i> (Watanabe et al. 1988)
80	MC-(H4)YR = MC-ThTyrR	1049,5	525,3	Ala	ThTyr	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	k.A.	nicht spezifizierte Cyanobakterien-Blüte im Lake Suwa 2005 (Mayumi et al. 2006)
81	[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-HtyY	1052,5	526,8	Ala	Hty	Asp	Tyr	Adda	Glu	Dhb	k.A.	<i>Microcystis spp.</i> (Namikoshi et al. 1992a)
82	[D-Asp ³ ,ADMAdda ⁵ ,Dhb ⁷]MC-RR	1053,6	526,8	Ala	Arg	Asp	Arg	ADMAdda	Glu	Dhb	k.A.	<i>Planktothrix sp.</i> (Christiansen et al. 2008)
83	[Glu-OC ₃ H ₆ (CH ₃)OH ⁶]MC-LR	1053,6	527,3	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	GluX	Mdha	>1000	<i>Nostoc sp.</i> (Beattie et al. 1998)
84	[D-Asp ³]MC-WR	1054,5	527,8	Ala	Trp	Asp	Arg	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>Microcystis spp.</i> (Namikoshi et al. 1992a)
85	MC-HtyR	1059,6	530,3	Ala	Hty	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	80-100	<i>M. aerug.</i> (Lee & Chou 2000)
86	[L-Ser ⁷]MC-HtyR	1063,5	532,3	Ala	Hty	MeAsp	Arg	Adda	Glu	L-Ser	k.A.	<i>Ana. flos-aquae</i> (Harada et al. 1991b)
87	[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-HtyHty	1066,5	533,8	Ala	Hty	Asp	Hty	Adda	Glu	Dhb	k.A.	(Namikoshi et al. 1992c)
88	MC-HarHar	1066,5	533,8	Ala	Har	MeAsp	Har	Adda	Glu	Mdha	k.A.	<i>Planktothrix sp.</i> (Christiansen et al. 2008)
89	MC-WR	1068,6	534,8	Ala	Trp	MeAsp	Arg	Adda	Glu	Mdha	150-200	<i>Microcystis spp.</i> (Frias et al. 2006)
90	[D-Asp ³ ,ADMAdda ⁵ ,Dhb ⁷]MC-HtyR	1073,5	537,3	Ala	Hty	Asp	Arg	ADMAdda	Glu	Dhb	k.A.	<i>Microcystis spp.</i> (Namikoshi et al. 1992a)
91	[L-MeLan ⁷]MC-LR	1115,7	558,4	Ala	Leu	MeAsp	Arg	Adda	Glu	MeLan	1000	<i>Nostoc sp.</i> (Beattie et al. 1998)

Die Biosynthese der MCs erfolgt nichtribosomal an großen modularen Multienzymkomplexen. Das Microcystinsynthetase-Gencluster (*mcy*) besteht in *Planktothrix agardhii* aus 9 (Christiansen et al. 2003) und in *Microcystis aeruginosa* (Tillett et al. 2000, Nishizawa et al. 2000 & 2001) sowie *Anabaena sp.* (Rouhiainen et al. 2004) aus 10 Genen, die als zwei Operons ab- und aufwärts einer bidirektionalen regulatorischen Promotorregion transkribiert werden und für Polyketidsynthasen (PKS), nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) und *Tailoring*-Enzyme kodieren.

MCs wirken als Hepatotoxine, da sie nach gastrointestinaler Exposition über Gallensäuretransporter (Ito et al. 2000) und die Pfortader (*Vena portae*) primär in die Leber gelangen. Über die Blutbahn können MCs auch andere Organe (Gehirn, Nieren, Muskulatur, etc.) beeinträchtigen (Magalhaes et al. 2003, Xie et al. 2005). Der toxische Mechanismus basiert auf der Hemmung des katalytischen Zentrums der eukaryotischen Serin/Threonin-Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1, PP2A) durch Interaktion der Glutaminsäure sowie der Adda-Seitenkette (Goldberg et al. 1995). Dabei bindet der Mdha⁷-Rest der MCs kovalent mit dem Cys-273 der PP1 bzw. dem Cys-266 der PP2A (Mackintosh et al. 1995, Runnegar et al. 1995a). Die Hemmung der PPs führt zur Hyperphosphorylierung der Proteine und dadurch zur Veränderung des Zytoskeletts sowie zur Störung der zellulären Regulation und Signaltransduktion (Eriksson et al. 1990, Ohta et al. 1992). Der gestörte Zellkontakt der Hepatozyten bewirkt eine Instabilität der Sinuskapillaren und verursacht intraperitoneale Hämorrhagien sowie Leberfunktionsstörungen (Carmichael 2001). Strukturelle Variationen im Adda- oder Glutamylrest der

MCs beeinflussen maßgeblich deren Toxizität. Insbesondere inaktivieren Glutaminsäureester und (6Z)-Adda-Isomere im Heptapeptid die toxische Wirkung der PP-Hemmung (Nishiwaki-Matsushima et al. 1991, Abdelrahman et al. 1993, Rinehart et al. 1994.). Auch reduziert die Substitution von *L*-Leu² mit hydrophilen Aminosäuren wie Arg die Toxizität (Stotts et al. 1993). MCs wirken im Kontext der PP-Inhibition als Tumorpromotoren in Leber, Haut und Colon, indem die Hyperphosphorylierung des Tumorsuppressors p53 zur Inaktivierung dieses regulatorischen Proteins führt (Falconer 1991, Nishiwaki-Matsushima et al. 1992, Yatsunami et al. 1993, Humpage et al. 2000). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch MCs führt zu oxidativem Stress bzw. Membranschäden aufgrund der Peroxidation von Lipiden (Ding et al. 1998 & 2000, Jos et al. 2005, Morena et al. 2005). Die Genotoxizität der MCs wurde mittels Ames-Test, *Comet Assay* und Mikrosatellitentest bestätigt (Suzuki et al. 1998, Ding et al. 1999). Die Biotransformation der MCs ist durch die Konjugation von Glutathion (GSH) gekennzeichnet, wobei Peptidasen unter Bildung eines Cystein-Konjugats Glutaminsäure und Glycin abspalten (Pflugmacher et al. 1998). Die Exkretion erfolgt über die Galle in den Darm (Sahin et al. 1996).

MCs können mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Proteinphosphatase Inhibition Assay* (PPIA) sowie durch HPLC-UV und LC-MS(/MS) analysiert werden. Die chromatografische Trennung der Heptapeptide erfolgt an apolaren C18-Phasen. Die Trennungseffizienz kann durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) zur mobilen Phase (Acetonitril/Wasser) erhöht werden. TFA agiert als Ionenpaarreagenz und bewirkt die vollständige Protonierung der Carboxylgruppen durch Senkung des pH-Wertes. Auf Basis der Methode von Lawton et al. (1994) trat 2005 die internationale Norm ISO 20179 zur Kontrolle des WHO-Richtwertes von 1,0 µg MC-LR je Liter Trinkwasser in Kraft. Die Methode wurde für MC-LR, -RR und -YR validiert und sieht die Anreicherung der MCs mittels C18-Festphasenextraktion vor. Die Detektion erfolgt UV-spektrophotometrisch bei 238 nm entsprechend dem Absorptionsmaximum der Aminosäure Adda und bedingt die vollständige chromatografische Trennung der zu detektierenden MCs. Trp verschiebt das Absorptionsmaximum auf 220 nm (Lawton et al. 1994), während (6Z)-Adda-Stereoisomere UV-Strahlung bei 242 nm maximal absorbieren (Harada et al. 1990).

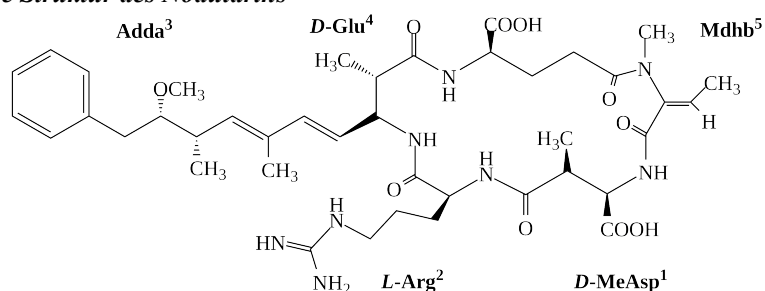
Die Ionisierung der MCs wird bei der massenspektrometrischen Detektion wesentlich durch die Anzahl der Arg-Reste im Peptid beeinflusst, da die Guanidinogruppe eine bevorzugte Protonierungsstelle darstellt. MCs mit Arg/Har an Position 2 und 4 bilden daher vorwiegend doppelt geladene $[M+2H]^{2+}$ -Ionen, während jene mit nur einem Arg/Har

vorwiegend einfach geladene $[M+H]^+$ -Ionen bilden. Heptapeptide ohne Arg/Har bilden ausschließlich $[M+H]^+$ -Ionen, deren dominante Protonierungsstelle im Adda-Rest lokalisiert ist (Edwards et al. 1993, Yuan et al. 1999a/b, Meriluoto et al. 2004). Typische MS/MS-Produkt-Ionen leiten sich durch Abspaltungen von $C_6H_5-CH_2-CH-OCH_3$ (Adda-Fragment, m/z 135), H_2O , NH_3 , CO_2 , CO und CH_3OH sowie durch sequenzabhängige Fragmente nach Spaltungen der Peptidbindungen ab (Yuan et al. 1999a, Diehnelt et al. 2006). Die Aminosäuresequenz und damit die Lokalisation von Desmethylierungen kann durch spezifische Fragmente weitgehend identifiziert werden. Die Unterscheidung der Isomere Mdha und Dhb ist hingegen auf der Basis tandemmassenspektrometrischer Untersuchungen nicht eindeutig möglich. Desmethyl-Adda-MCs besitzen anstelle einer Methoxy-Gruppe eine Hydroxyl-Gruppe und lassen sich über das charakteristische Fragment $C_6H_5-CH_2-CH-OH$ bei m/z 121 nachweisen. Indes wurde für 9-Acetoxy-Derivate nicht das zu erwartende Fragment $C_6H_5-CH_2-CH-O-COCH_3$ bei m/z 163 beschrieben, sondern das Fragment m/z 135 (Yuan et al. 1998).

2.1.2 Nodularine

Nodularine (NODs, Abb. 2) sind zyklische Pentapeptide mit einem Molekulargewicht zwischen 768 und 843 g mol^{-1} und einer allgemeinen Aminosäuresequenz von (1) *D-erythro*- β -Methylasparaginsäure (MeAsp), (2) *L*-Arginin (Arg, R), (3) 3-Amino-9-Methoxy-2,6,8-Trimethyl-10-Phenyldeca-4,6-Diensäure (Adda), (4) *D*-Glutaminsäure und (5) 2-Methylamino-2-Butensäure (2-Methyl-Dehydrobutyrine, Mdhb). Bisweilen wird nomenklatorisch von NOD-R gesprochen, um die Variabilität der Position 2 (*L*-Arg) des Moleküls hervorzuheben. Indes kommen Strukturvariationen an allen 5 Aminosäuren des Peptids vor, darunter Desmethylierungen an den Positionen 1, 3 und 5, Methylierungen an Position 3, Veresterungen der Glutaminsäure und Substitutionen der Position 2 durch *L*-Homoarginin (*L*-Har) und *L*-Valin (*L*-Val, V). Strukturvarianten der Nodularine sind im Vergleich zu den verwandten Microcystinen weniger zahlreich, bisher wurden 12 Nodularine beschrieben (Tab. 2). Die Produktion von Nodularin ist auf die Gattung *Nodularia* beschränkt, indes wurde $[L\text{-Val}^2]\text{NOD}$ (Motuporin) im marinen Schwamm *Theonella swinhoei* nachgewiesen, der mit symbiotischen Cyanobakterien assoziiert ist (de Silva et al. 1992). Strukturelle Analogien zwischen NODs und MCs gründen sich in analogen Mechanismen der Biosynthese (Dittmann & Wiegand 2006). Sequenzanalysen der Microcystin- (*mcy*) und Nodularinsynthetase-Gene (*nda*) deuten auf frühe gemeinsame Vorfahren in der Evolution hin (Rantala et al. 2004).

Abb. 2 Chemische Struktur des Nodularins



Tab. 2 Übersicht der bisher beschriebenen Nodularinvarianten

Nr.	NOD-Variante	[M+H] ⁺	Aminosäuresequenz					LD50 µg/kg	Vorkommen (Literatur)
			1	2	3	4	5		
1	[L-Val ²]NOD (Motuporin)	768,5	MeAsp	L-Val	Adda	D-Glu	Mdhb	k.A.	<i>Theonella swinhoei</i> (de Silva et al. 1992)
2	[Asp ¹]NOD	811,5	Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	Mdhb	75	<i>Nodularia spumigena</i> (Namikoshi et al. 1994)
3	[DMAdda ³]NOD	811,5	MeAsp	L-Arg	DMAdda	D-Glu	Mdhb	150	<i>Nodularia spumigena</i> (Namikoshi et al. 1994)
4	[Dhb ⁵]NOD	811,5	MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dhb	k.A.	<i>Nodularia spumigena</i> (Mazur-Marzec et al. 2006)
5	NOD	825,5	MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Mdhb	50-70	<i>Nodularia spumigena</i> (Rinehart et al. 1988, Carmichael et al. 1988b, Eriksson et al. 1988, Runnegar et al. 1988, Sivonen et al. 1989a, Sandström et al. 1990)
6	[(6Z)Adda ³]NOD	825,5	MeAsp	L-Arg	(6Z)Adda	D-Glu	Mdhb	>2000	<i>Nodularia spumigena</i> (Namikoshi et al. 1994)
7	[D-MeAbu ⁵]NOD	827,5	MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	D-MeAbu	150	Synthese durch Reduktion mit Natriumborhydrid aus <i>N. spumigena</i> -Extrakten (Namikoshi et al. 1993)
8	[L-MeAbu ⁵]NOD	827,5	MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	L-MeAbu	150	Synthese durch Reduktion mit Natriumborhydrid aus <i>N. spumigena</i> -Extrakten (Namikoshi et al. 1993)
9	[MeAdda ³]NOD	839,5	MeAsp	L-Arg	MeAdda	D-Glu	Mdhb	k.A.	<i>Nodularia spumigena</i> (Mazur-Marzec et al. 2006)
10	[D-Glu(OMe) ⁴]NOD	839,5	MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu(OMe)	Mdhb	>1200	<i>Nodularia spumigena</i> (Rinehart et al. 1994)
11	[L-Har ²]NOD	839,5	MeAsp	L-Har	Adda	D-Glu	Mdhb	70	<i>Nodularia PCC7804 sphaerocarpa / harveyana</i> (Beattie et al. 2000, Saito et al. 2001)
12	lineares NOD	843,5	MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Mdhb	>2000	<i>Nodularia spumigena</i> (Choi 1992, Choi et al. 1993)

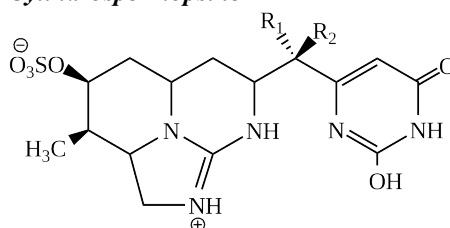
Der Mechanismus der NOD-Biosynthese wurde von Moffitt & Neilan (2004) aufgeklärt, die entgegen der Hypothese von Christiansen et al. (2003), wonach das *mcy*-Cluster durch Insertion des zweiten NRPS-Moduls von *mcyA* und des ersten NRPS-Moduls von *mcyB* aus dem *nda*-Cluster hervorgegangen sei, die Hypothese von Rantala et al. (2004) unterstützen, wonach das *nda*-Cluster durch Deletion des entsprechenden NRPS-Moduls aus dem *mcy*-Cluster hervorgehe. Gleichsam liegt der Schluss nahe, NODs als extreme strukturelle Varianten der MCs zu verstehen (Rantala et al. 2003). Dies zeigt sich nicht zuletzt in der analogen Toxizität der NODs als potente Inhibitoren der PP1 und PP2A. Im Gegensatz zu MCs binden NODs jedoch nicht-kovalent an Proteinphosphatasen (Bagu et al. 1997). Dabei wirken NODs nicht nur als Tumorpromotoren, sondern zugleich als Tumorinitiatoren (Ohta et al. 1994, Bouaicha & Maatouk 2004).

Die Analysemethoden für MCs sind weitestgehend auf NODs übertragbar. Tandemmassenspektrometrische Untersuchungen ermöglichen die eindeutige Identifikation der Strukturvarianten der NODs, insbesondere der desmethylierten Formen (*m/z* 811,5; dm-NODs). [DMAdda³]NOD zeigt spezifische Fragmente bei *m/z* 121, 366, 383, 646, 691 und 674 amu, während [D-Asp¹]NOD bei *m/z* 135, 209, 227, 253, 289 und 452 amu sowie [Dhb⁵]NOD bei *m/z* 135, 195, 213, 239, 303, 375 und 466 amu in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie (CE) fragmentieren (Karlsson et al. 2003, Mazur-Marzec et al. 2006).

2.1.3 Cylindrospermopsine

Cylindrospermopsine (CYNs) sind Alkaloide mit trizyklischem Guanidinring und einer Hydroxymethyluracil-Einheit. Vom Namensgeber Cylindrospermopsin (CYN) leitet sich das Tautomer 7-Deoxycylindrospermopsin (DoCYN) und das Epimer 7-Epicylindrospermopsin (EpiCYN) ab (Abb. 3, Tab. 3).

Abb. 3 Chemische Struktur der Cylindrospermopsine



Tab. 3 Übersicht der bisher beschriebenen Cylindrospermopsine

Nr.	Toxin	[M+H] ⁺	R1	R2	LD50 µg/kg	Vorkommen (Literatur)
1	Cylindrospermopsin	416	H	OH	2100	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Hawkins et al. 1985, Ohtani et al. 1992), <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (Preußel et al. 2006), <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> (Banker et al. 1997), <i>Aphanizomenon gracile</i> (Wiedner et al. 2007), <i>Umezakia natans</i> (Harada et al. 1994), <i>Anabaena bergii</i> (Schembri et al. 2001), <i>Anabaena lapponica</i> (Spoof et al. 2006), <i>Anabaena aphanizomenoides</i> (Wiedner et al. 2007) <i>Raphidiopsis curvata</i> (Li et al. 2001a), <i>Lyngbya wollei</i> (Seifert et al. 2007)
2	7-Deoxycylindrospermopsin (DoCYN)	400	H	H	k.A.	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Norris et al. 1999, Li et al. 2001b), <i>Lyngbya wollei</i> (Seifert et al. 2007), <i>Raphidiopsis curvata</i> (Li et al. 2001a)
3	7-Epicylindrospermopsin (EpiCYN)	416	OH	H	2100	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i> (Banker et al. 2001)

Die Toxizität von CYN wurde erstmals 1979 im Zuge der „Palm Island Mystery Disease“ in Queensland, Australien, evident, bei der 150 Fälle von Hepatoenteritis aufgrund einer mit *Cylindrospermopsis raciborskii* kontaminierten Trinkwasserquelle dokumentiert wurden (Byth 1980). Die ausgeprägte Hepatotoxizität von CYN resultiert aus der Aufnahme durch Gallensäuretransporter. CYN hemmt die Proteinbiosynthese vollständig und irreversibel (Froschio et al. 2003). Außerdem verursacht CYN insbesondere bei chronischer Exposition Schäden an Nieren (tubuläre Läsionen), Lunge, Herz, Magen und dem lymphatischen System (Hawkins et al. 1985, Humpage & Falconer 2003). CYN hat sich ferner als genotoxisch erwiesen (Humpage et al. 2005), es vermag kovalent an DNA zu binden (Shaw et al. 2000) sowie Strangbrüche zu induzieren (Shen et al. 2002) und steht unter Verdacht als Humankarzinogen zu wirken (Falconer & Humpage 2001). Zusätzlich hemmt CYN die Glutathionsynthese (Runnegar et al. 1995b) und erfährt nach Oxidation durch das Cytochrom-P450-Enzymsystem eine Bioaktivierung (Shaw et al. 2000). Die Stellung der Hydroxylgruppe am C7 ist für die Toxizität unbedeutend, da CYN und EpiCYN eine vergleichbare Wirkung entfalten (Ohtani et al. 1992). Das Fehlen der Hydroxylgruppe beim DoCYN hat indes eine erhebliche Reduktion der Toxizität zur Folge, die auf den Keto-Enol-Status der Uracilgruppe zurückgeführt wird (Norris et al. 1999, Sukenik et al. 2006). Zur vorläufigen toxikologischen Bewertung von CYN-Konzentrationen in Trinkwasser empfehlen Humpage & Falconer (2003) einen Grenzwert

von $1 \mu\text{g l}^{-1}$, in Brasilien gilt ein Leitwert von $15 \mu\text{g l}^{-1}$ und in Neuseeland von $2 \mu\text{g l}^{-1}$ (Wiedner et al. 2007).

CYNs können nach HPLC-Trennung mit stationären Octadecyl- (Harada et al. 1994) oder Amidphasen (Banker et al. 1997) bei λ 262 nm UV-spektrophotometrisch detektiert werden (Ohtani et al. 1992). Außerdem besteht die Möglichkeit der LC-MS/MS-Bestimmung (Eaglesham et al. 1999) zur eindeutigen Detektion von CYN bei m/z 416 $[\text{M}+\text{H}]^+$ > 336 $[\text{M}+\text{H} - \text{SO}_3]^+$, 318 $[\text{M}+\text{H} - \text{SO}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$, 274 $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_3\text{S}]^+$, 194 $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{ON}_3]^+$ und 176 $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_3]^+$ und DoCYN bei m/z 400 $[\text{M}+\text{H}]^+$ > 320 $[\text{M} - \text{SO}_3 + \text{H}]^+$, 302 $[\text{M}+\text{H} - \text{SO}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$, 274 $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_3\text{S}]^+$, 194 $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{ON}_3]^+$ und 176 $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_3]^+$ (Dell'Aversano et al. 2004). Für EpiCYN liegen keine Fragmentierungsdaten vor.

2.2 Neurotoxine

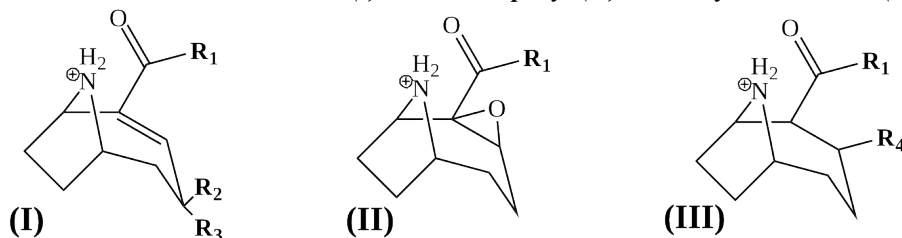
2.2.1 Anatoxin-a

Anatoxin-a (ANA, 2-Acetyl-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en, Abb. 4), sein Methylanalogon Homoanatoxin-a (HANA) sowie das Derivat 11-Carboxylanatoxin-a (CarboxylanA) sind von den Tropanalkaloiden abgeleitete, bityklische sekundäre Amine mit Struktur analogie zum Kokain. Die Neurotoxine sind in protonierter Form wesentlich stabiler als in freier Basenform (Duy et al. 2000). Die Biosynthese erfolgt in cyanobakteriellen Zellen ausgehend vom Ornithin und der enzymatischen Decarboxylierung zum Putrescin (Apeldoorn et al. 2007). Durch bakterielle, alkalische oder (UV-)strahlungsinduzierte Degradation von ANA und HANA können Hydroxy- (HydroxyANA, HydroxyHANA), Keto- (KetoHANA), Epoxy- (EpoxyANA, EpoxyHANA) und Dihydroderivate (DihydroANA, DihydroHANA, Dihydromethoxy-HANA) gebildet werden, die sämtlich keine toxischen Effekte entfalten (Abb. 4, Tab. 4).

ANA und HANA vermögen an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren der Natriumkanäle am postsynaptischen Spalt der Nervenzellen (z.B. des Zentralnervensystems, des vegetativen Nervensystems und der neuromuskulären Endplatte) zu binden. Dadurch induzieren sie wie der Neurotransmitter Acetylcholin die Öffnung der ligandengesteuerten Natriumkanäle, mithin eine Depolarisation der Zelle durch das Einstromen von Natriumionen. Nach Überschreitung eines Schwellenpotentials öffnen sich spannungssensitive Natriumkanäle und ein Aktionspotential entsteht, welches durch Calciumeinstrom beispielsweise eine temporäre Kontraktion der Muskulatur auslöst, die sich als Faszikulieren (unkoordiniertes Muskelzittern) äußert. Indes bleibt die Depolarisation der Zelle perennierend, da ANA und HANA nicht durch die Acetylcholinesterase abgebaut

werden. Infolge der Verhinderung einer Repolarisation der Zelle als Voraussetzung für die Induktion weiterer Aktionspotentiale wird die neuronale Reizweiterleitung sowie die neuromuskuläre Erregbarkeit unterbunden. In der Folge ergeben sich paralytische Symptome.

Abb. 4 Chemische Struktur der Anatoxine (I) sowie der Epoxy- (II) und Dihydroanatoxine (III)



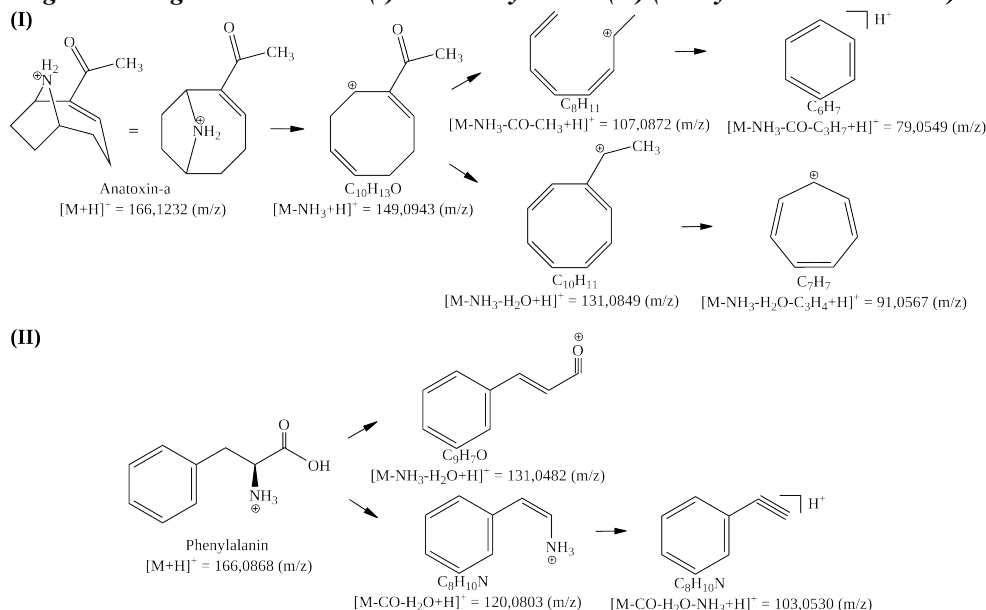
Tab. 4 Übersicht der bisher beschriebenen Strukturanaloga und Derivate von Anatoxin-a

Nr.	Anatoxin	R1	R2	R3	R4	[M+H] ⁺	[M-NH ₃ +H] ⁺	LD50 μg/kg	Vorkommen (Literatur)
1	Anatoxin-a	CH ₃	H	H		166	149	200-250	<i>Aph. f.-a.</i> (Bumke-Vogt et al. 1999), <i>Aph. ssp.</i> (Carmichael 1992), <i>Aph. issatschenkoi</i> (Wood et al. 2007), <i>Oscillatoria sp.</i> (Edwards et al. 1992), <i>Cylindrospermum sp.</i> (Sivonen et al. 1989b), <i>Ana. f.-a.</i> (Devlin et al. 1977), <i>Ana. circinalis</i> , <i>lemmermannii</i> und <i>spiroides</i> (Gugger et al. 2005), <i>M. aerug.</i> (Park et al. 1993), <i>Raph. mediterranea</i> (Namikoshi et al. 2003), <i>Arthrospira fusiformis</i> (Ballot et al. 2005), <i>Phormium favesum</i> (Gugger et al. 2005)
2	Homoanatoxin-a	C ₂ H ₅	H	H		180	163	200-250	<i>Oscillatoria formosa</i> (Skulberg et al. 1992), <i>Raph. mediterranea</i> (Namikoshi et al. 2003), <i>Anabaena sp.</i> (Furey et al. 2003b)
3	4S-Hydroxy-anatoxin-a	CH ₃	OH	H		182	165	k.A.	} <i>Raph. mediterranea</i> (Namikoshi et al. 2004),
4	4R-Hydroxy-anatoxin-a	CH ₃	H	OH		182	165	k.A.	
5	4-Hydroxyhomoanatoxin-a	C ₂ H ₅	OH	H		196	179	k.A.	
6	4-Keto-homoanatoxin-a	C ₂ H ₅	O	O		210	193	k.A.	<i>Raph. mediterranea</i> (Namikoshi et al. 2004)
7	11-Carboxyl-anatoxin-a	CH ₂ COOH	H	H		210	193	k.A.	<i>Aph. issatschenkoi</i> (Selwood et al. 2007)
8	2,3-Epoxy-anatoxin-a	CH ₃			H	168	150	k.A.	} <i>Planktothrix sp.</i> (James et al. 2005)
9	2,3-Epoxy-homoanatoxin-a	C ₂ H ₅				196	178	k.A.	
10	2,3-Dihydro-anatoxin-a	CH ₃			H	168	150	k.A.	
11	2,3-Dihydro-homoanatoxin-a	C ₂ H ₅			H	182	164	k.A.	} <i>Planktothrix sp.</i> (James et al. 2005)
12	2,3-Dihydro-3-methoxyhomoanatoxin-a	C ₂ H ₅			OCH ₃	212	194	k.A.	

ANAs können nach Extraktion mit einem polaren Lösungsmittel u.a. gaschromatografisch getrennt und mit einem Elektroneneinfang-Detektor (ECD, *electron capture detector*) detektiert werden (Stevens & Krieger 1988). Außerdem können ANAs nach HPLC-Trennung mittels UV-Detektor bei λ 227 nm (Harada et al. 1989) detektiert werden, wobei Epoxy- und DihydroANAs mangels ungesättigter Ketonstruktur nicht erfasst werden. Ferner besteht die Möglichkeit der fluorimetrischen Detektion aller Strukturanaloga und Derivate von ANA nach Derivatisierung mit 4-Fluoro-7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol (NBD-F) bei λ_{Ex} 470 nm und λ_{Em} 530 nm (James et al. 1997). Auch wurden zahlreiche (tandem-)massenspektrometrische Methoden etabliert (Poon et al. 1993, Bumke-Vogt et al. 1999, Hormazabel et al. 2000, Draisci et al. 2001). Ein Verfahren zur Detektion der ANAs mittels quantitativer ¹H NMR-Spektroskopie wurde ebenfalls entwickelt (Dagnino & Schripsema 2005). Der eindeutige Nachweis von ANA ist jedoch nicht trivial, da es durch eine Verwechslung mit der proteinogenen Aminosäure Phenylalanin (Phe) zu falsch-

positiven Resultaten kommen kann (James et al. 2005). Phenylalanin hat den gleichen Wert von m/z 166 für $[M+H]^+$, zeigt ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster (Bogialli et al. 2006) und weist eine vergleichbare chromatografische Retention auf. Deshalb wurde versucht, ANA und Phe chromatografisch zu trennen (Gugger et al. 2005) und mit Hilfe von MS/MS-Fragmentierungen (Furey et al. 2003a & 2005) selektiv zu detektieren (Abb. 5).

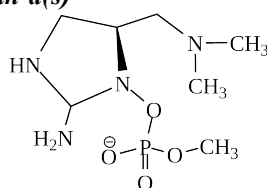
Abb. 5 Fragmentierung von Anatoxin-a (I) und Phenylalanin (II) (Furey et al. 2003a & 2005)



2.2.2 Anatoxin-a(s)

Anatoxin-a(s) (ANAS, Abb. 6), (5S)-2-Amino-4,5-dihydro-1-[(hydroxymethoxyphosphinyl)oxy]-N,N-dimethyl-1H-imidazol-5-methanamin, stellt als natürlich vorkommender Phosphatester des N-Hydroxyguanidins ein natürliches Analogon der anthropogenen Organophosphorpestizide (z.B. Malathion und Parathion) dar. Der Trivialname ist der vergleichbaren Intoxikationssymptomatik von ANA und ANAS geschuldet. Dabei steht das Suffix „(s)“ für *salivation factor*, d.h. den Speichelfluss anregend (Apeldoorn et al. 2007). Indes unterscheiden sich ANAS und ANA sowohl in der chemischen Struktur als auch im toxischen Mechanismus. ANAS hemmt die Acetylcholinesterase direkt und irreversibel, so dass Acetylcholin an den ligandengesteuerten Natriumkanälen nicht in Cholin und Essigsäure gespalten werden kann und eine resultierende dauerhafte Depolarisation der Zelle zunächst zur Faszikulation der Muskulatur und schließlich, durch Verhinderung des Repolarisationszyklus, zur Paralyse (z.B. Atemlähmung) führt (Mahmood & Carmichael 1987). ANAS zeigte im Tierversuch bei einem LD₅₀-Wert (Maus, i.p.) von 20 µg kg⁻¹ KG eine hohe Toxizität (Carmichael et al. 1990).

Abb. 6 Chemische Struktur von Anatoxin-a(s)



Produzenten von ANAS sind *Ana. flos-aquae* (Mahmood & Carmichael 1987, Matsunaga et al. 1989), *Ana. lemmermannii* (Onodera et al. 1997a, Henriksen et al. 1997) und *Ana. oumiani* (Dörr et al. 2009). Die Analytik von ANAS ist insofern problematisch, da bisher keine Standards dieser neurotoxischen Substanz kommerziell erhältlich sind. Neben der unspezifischen Acetylcholinesterase-Hemmung, die gleichermaßen für andere Organophosphorpestizide zutrifft, weist ANAS eine UV-Absorption im Bereich von 220-230 nm auf (Onodera et al. 1997a, Henriksen et al. 1997). Für die chromatografische Trennung der sehr polaren Substanz eignet sich insbesondere die Hydrophile Interaktionsflüssigchromatografie (HILIC). Jüngst wurde eine LC-MS/MS-Methode zum selektiven Nachweis von ANAS entwickelt, wonach spezifische Massenübergänge von m/z 253>58, 253>159, 235>98 und 235>96 amu eine eindeutige Identifikation ermöglichen (Dörr et al. 2009).

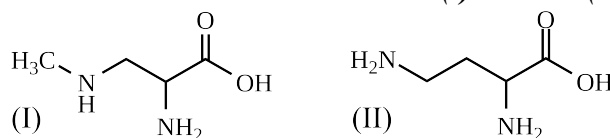
2.2.3 β -N-Methylamino-L-Alanin (BMAA) und 2,4-Diaminobuttersäure (DAB)

Die nichtproteinogene Aminosäure β -N-Methylamino-L-Alanin² (BMAA, Abb. 7) hat ein Molekulargewicht von 118,13 g mol⁻¹ und kann chemisch synthetisiert werden (Moura & Pinto 2007). BMAA wurde erstmals in Samen der altertümlichen Pflanze *Cycas micronesica*³ (Mikronesischer Sagopalme) identifiziert (Vega & Bell 1967, Polsky et al. 1972, Ludolph et al. 1988). Zuvor wähten Vega & Bell (1967), die Neurotoxizität von *Cycas* sei auf das mögliche Vorkommen des Isomers 2,4-Diaminobuttersäure (DAB, Abb. 7) zurückzuführen. DAB wurde in freier Form in Leguminosen wie *Lathyrus latifolius* (Ressler et al. 1961, Bell et al. 1996) und *Crotalaria spp.* (Pilbeam & Bell 1979) sowie in gebundener Form als Bestandteil des Peptidoglycans Murein in den Zellwänden zahlreicher Bakterien nachgewiesen (Schleifer & Kandler 1972, Fiedler & Kandler 1973). Es entfaltet eine neurotoxische Wirkung über die Hemmung der Aufnahme des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) in Neuronen und Gliazellen (Iversen & Kelly 1975). Außerdem hemmt DAB kompetitiv die Ornithincarbamoyltransferase und verursacht folglich eine chronische Ammoniak-Toxizität (O'Neal et al. 1968).

² Synonyme für BMAA sind α -Amino- β -Methylaminopropionsäure (MeDAP) oder S(+)- β -Methyl- α,β -Diaminopropionsäure.

³ Die Sagopalme (Cycas) werden in diesem Zusammenhang als lebende Fossilien bezeichnet.

Abb. 7 Chemische Struktur der neurotoxischen Isomere BMAA (I) und DAB (II)



BMAA bildet im exponierten Organismus Carbamataddukte (BMAA- α -NCO₂, BMAA- β -NCO₂), die als Glutamat-Agonisten, ähnlich wie das *Lathyrus*-Toxine β -N-Oxylamino-L-Alanin (BOAA)⁴ (Kusama-Eguchi et al. 2006, Fikre et al. 2008), an AMPA⁵-, Kainat- und NMDA⁶-Rezeptoren exzitatorisch wirken (Spencer et al. 1986 & 1987, Myers & Nelson 1990, Spencer 1990, Seawright et al. 1999, Andersson et al. 1997). Das Neurotoxin induziert eine pathologische Erhöhung intrazellulärer Calciumkonzentrationen der Nervenzellen und dadurch eine Unterbrechung der Signalweiterleitung infolge der Daueraktivierung (Brownson et al. 2002), die sich akut symptomatisch als Ataxie, Faszikulation und schließlich Paralyse äußert. BMAA scheint die Blut-Hirn-Schranke trotz seiner Hydrophilie überwinden zu können (Cox et al. 2003) und steht unter Verdacht, die neurodegenerative Erkrankung des Amyotrophen Lateralsklerosis-Parkinson-Demenz-Komplexes (ALS-PDC) zu verursachen (Ince & Codd 2005, Papapetropoulos 2007). Indes wird die Hypothese kontrovers diskutiert (Buenz und Howe 2007). Cruz-Aguado et al. (2006) konnten in Fütterungsexperimenten mit Mäusen keine neurodegenerativen Symptome nach Exposition mit BMAA eruieren, jedoch kann der relativ kurze Lebenszyklus der Nager kein adäquates Modell einer subchronischen Langzeitexposition in der Ätiologie von ALS-PDC beim Menschen simulieren (Karamyan & Speth 2008). BMAA induziert die Schädigung bzw. selektive Destruktion der Motoneuronen bei Konzentrationen von 10 μ M (Lobner et al. 2007) bzw. 30 μ M (Rao et al. 2006). Außerdem wird der nichtproteinogenen Aminosäure im Kontext progressiver neurodegenerativer Erkrankungen die Fähigkeit zugeschrieben, durch Insertion während der Proteinbiosynthese einen Kettenabbruch zu induzieren sowie die Tertiärstruktur der Proteine zu modulieren und ihre funktionelle Integrität durch Fehlfaltung nachhaltig zu stören. Die saure Hydrolyse von *Cycas*-Proteinen deutete erstmals auf das Vorkommen von proteingebundenem BMAA hin (Banack et al. 2007), wobei diese Hypothese durch den Nachweis einer Insertion der nichtproteinogenen Aminosäure in synthetische Peptide untermauert wurde (Seebach et al. 1994). Obwohl die chemische Natur der hydrophilen

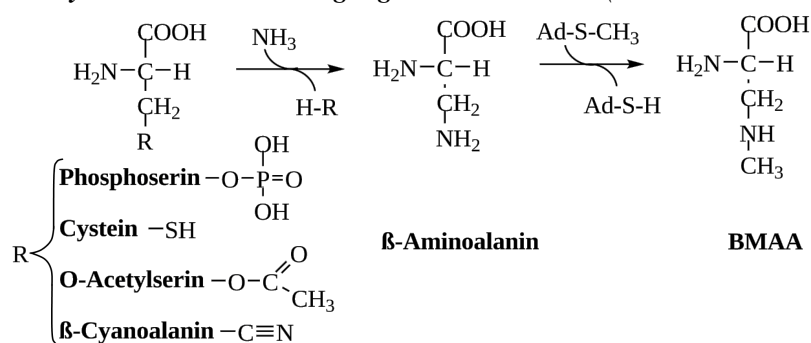
4 BOAA ist auch als β -Oxalyl-L- α,β -Diaminopropionsäure (ODAP) bekannt. Das Neurotoxin der Saat-Platterbse (*Lathyrus sativus*, *Fabaceae*) verursacht die neurologische Erkrankung des Lathyrismus und wirkt agonistisch an Kainat- und AMPA-, nicht aber an NMDA-Rezeptoren.

5 Der synthetische Agonist α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure leiht diesem ionotropen Glutamatrezeptor seinen Namen.

6 N-Methyl-D-Aspartat ist der namensgebende Agonist dieses ionotropen Glutamatrezeptors.

Aminosäure eine Bioakkumulation kaum nahelegte, wurde die Annahme postuliert, dass BMAA, im Zuge einer Exposition, von körpereigenen Proteinen gebunden und als neurotoxisches Reservoir nur langsam freigesetzt würde (Spencer et al. 1991, Murch et al. 2004a). Öffentliches Interesse erregte BMAA erstmals im Kontext der sogenannten Guam-Demenz. Guams⁷ indigene Bevölkerung der Chamorro zeigte eine 50-100-fach höhere Inzidenz für ALS-PDC als andere Populationen, was u.a. auf den Verzehr von *Cycas* zurückgeführt wurde (Whiting 1963, Kurland 1972, Spencer et al. 1987), dessen Saatkerne traditionell zu Mehl verarbeitet wurden, das durchschnittlich etwa 250 µg g⁻¹ BMAA enthält. Zunächst wurde vermutet, *Cycas* sei eine unwahrscheinliche Quelle für BMAA, da das entsprechende Mehl vor der Benutzung gewaschen wird und folglich kein freies BMAA mehr nachweisbar sei (Duncan et al. 1990), jedoch wurde das Vorkommen von proteingebundenem BMAA nicht berücksichtigt (Murch et al. 2004a). Im Gehirngewebe (Frontalcortex) verstorbener Chamorro sowie kanadischer Alzheimerpatienten konnte Protein-assoziiertes BMAA in Konzentrationen von 6,6 bzw. 7,0 µg g⁻¹ BMAA nachgewiesen werden (Murch et al. 2004b, Papapetropoulos 2007). Indes stellen Montine et al. (2005) die Bedeutung von BMAA in der Ätiologie neurodegenerativer Erkrankungen in Frage, nachdem in einer einmaligen nicht-replizierten Untersuchung kein BMAA im Gehirngewebe von ALS-PDC-Patienten aus Guam nachweisbar war.

Abb. 8 Potentielle Biosynthese von BMAA aus geeigneten Präkursoren (Brenner et al. 2003)



Bisher wurde *Cycas* eine im Pflanzenreich exklusive Fähigkeit zur Produktion von BMAA zugeschrieben, die als monophyletische Eigenschaft zur Pflanzenklassifizierung der *Cycadaceae* genutzt wurde (Loconte und Stevenson 1990, Charlton et al. 1992). Brenner et al. (2003) schlugen den in Abb. 8 visualisierten Biosynthesepfad von BMAA vor. Zunächst katalysiert eine Cysteinsynthase die nukleophile Reaktion geeigneter Präkursoren unter NH_3 -Transfer zum Intermediat β -Aminoalanin. Im Folgenden katalysiert eine Methyltransferase den Transfer einer Methylgruppe des S-Adenosylmethionins

⁷ Guam, ein nichtinkorporiertes Territorium der USA, ist die größte und südlichste Insel des Marianen-Archipels im westpazifischen Ozean.

(Ad-S-CH₃) zur β -substituierten Aminogruppe (Brenner et al. 2003). Cox et al. (2003) und Vessey et al. (2005) postulierten, dass nicht *Cycas*, sondern symbiotische Cyanobakterien (*Nostoc sp.*) an den coralloiden Wurzeln der Samenpflanze das durch Biomagnifikation⁸ akkumulierte BMAA synthetisieren. Die neurotoxische Aminosäure hat im Gegensatz zum Glutamat nur eine geringe Relevanz für den Stickstofftransfer in die Wurzeln, vielmehr könnte BMAA in *Cycas* als chemisches Abwehrmittel gegen Fraßfeinde fungieren, da es besonders in den äußeren Schichten der reproduktiven Organe angereichert wird (Banack & Cox 2003b). Für die Pflanze beschränkte sich folglich die Bedeutung der Symbiose mit Cyanobakterien nicht allein auf die Stickstofffixierung. Entgegen bisheriger Annahmen konnte auch in anderen nicht-verwandten Pflanzenspezies BMAA nachgewiesen werden. Der Große Algenfarn (*Azolla filiculoides*), eine Schwimmpflanze, die in Südostasien als Gründünger in Reisfeldern verwendet wird und in Symbiose mit *Anabaena azollae* lebt (Lechno-Yossef & Nierzwicki-Bauer 2002), enthielt 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ BMAA. In den Stielen des Mammutblattes (*Gunnera kawaiensis*), einer großblättrigen Angiosperme, die in cyanobakterieller Symbiose mit *Nostoc punctiforme* lebt (Bonnett 1990, Bergmann 2002), waren 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ BMAA nachweisbar (Cox et al. 2003). Am Beispiel von Guam wurde der Prozess der Biomagnifikation und die Bedeutung der Proteinassoziation von BMAA beschrieben (Cox et al. 2003, Banack & Cox 2003a): Während freilebende *Nostoc sp.* 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ BMAA produzierten, zeigten entsprechende symbiotische *Strains* Gehalte von 2-37 $\mu\text{g g}^{-1}$ BMAA. *Cycas*-Samen enthalten etwa 9 $\mu\text{g g}^{-1}$ BMAA in der fleischigen Schicht der Samenschale (Sarkotesta) und durchschnittlich 1161 $\mu\text{g g}^{-1}$ BMAA in der äußeren Samenschicht. Marianen-Flughunde (*Pteropus mariannus*) fressen diese Samen und akkumulieren etwa 3556 $\mu\text{g g}^{-1}$ BMAA (Cox & Sacks 2002, Cox et al. 2003, Banack et al. 2006). Letztlich verzehrten die *Chamorros* jene Flughunde traditionell angerichtet in einer Kokosnusscreme. Infolge des Beinahe-Aussterbens der Mariannenflughunde durch avanciertes Bejagen minimierte sich die Verzehrshäufigkeit in Korrelation mit einem deutlichen Rückgang der ALS-PDC-Inzidenz (Monson et al. 2003). Nicht nur mit Blick auf den Nachweis von BMAA in kanadischen Alzheimerpatienten scheint die Biomagnifikation der neurotoxischen Aminosäure in aquatischen wie terrestrischen Räumen keineswegs auf die Region von Guam begrenzt zu sein. Cox et al. (2005) entfachten eine Kontroverse über die potentielle synapomorphe Fähigkeit diverser Cyanobakterien zur Synthese von BMAA. In 37 von 41 symbiotischen und freilebenden

⁸ Der Prozess der Biomagnifikation ist die zunehmende Akkumulation bioaktiver, nicht selten schädlich wirkender Moleküle in höhere trophische Ebenen der Nahrungskette.

cyanobakteriellen *Strains* ubiquitärer Provenienz konnte BMAA in extrem hohen Gehalten von bis zu 6478 $\mu\text{g g}^{-1}$ ermittelt werden. Die physiologische Bedeutung von BMAA für die Biochemie der Cyanobakterien wird hinsichtlich der Modulation der Tertiärstruktur ihrer Proteine diskutiert. Weitere Studien um Cox et al. (Banack et al. 2007, Johnson et al. 2008, Metcalf et al. 2008) sowie Esterhuizen & Downing (2008) stützen die Hypothese eines omnipräsenten Vorkommens von BMAA in Cyanobakterien (Tab. 5). Demgegenüber untersuchten Rosén & Hellenäs (2008) insgesamt 36 verschiedene cyanobakterielle *Strains*, vermochten jedoch ohne Derivatisierung mittels HILIC-MS/MS im *Multi-Reaction-Monitoring*(MRM)-Modus (m/z 119>102 $[\text{M}+\text{H} - \text{NH}_3]^+$, 119>88 $[\text{M}+\text{H} - \text{CH}_3-\text{NH}_2]^+$, 119>76 $[\text{M}+\text{H} - \text{CH}_2=\text{N}-\text{CH}_3]^+$, 119>73 $[\text{M}+\text{H} - \text{HCOOH}]^+$, 119>44 $[\text{CH}_3-\text{NH}=\text{CH}_2]^+$) weder freies noch proteingebundenes BMAA nachzuweisen (Tab. 5). Indes konnte in einer Probe (*Calothrix* PCC7103) DAB in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden, zahlreiche andere Proben zeigten geringe DAB-Gehalte ($<50 \mu\text{g g}^{-1}$) nach saurer Hydrolyse. DAB spaltet im Gegensatz zum BMAA unter tandemmassenspektrometrischer Fragmentierung kein Methylamin (m/z 119>88) ab, ergibt jedoch die charakteristischen Produkt-Ionen von m/z 101 und 74. Gleichmaßen artikulieren Kubo et al. (2008) sowie Moura et al. (2009) angesichts negativer Untersuchungen auf freies BMAA mittels derivatisierungsfreier direkter Bestimmung Skepsis an den positiven Befunden für BMAA in Cyanobakterien, welche durchgehend auf Derivatisierungen mit 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate (AQC) oder dem *Phenomonex EZ:faastTM*-Kit beruhten. AQC bindet unter kurzen Reaktionszeiten universell an primäre und sekundäre Amine, produziert komplexe Derivate, die während der Hochdrucktrennung stabil sind und kann bis zu 6 Monate verlustfrei gelagert werden (Cohen & Michaud 1993). Außerdem ermöglicht AQC eine höhere Sensitivität und Trennungseffizienz als vergleichbare Derivatisierungsmethoden mit Phenylisothiocyanat (PITC), o-Phthaldialdehyd (OPA), 1-Dimethylaminonaphthalen-5 sulfonylchlorid (Dansyl-Cl) oder 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl), die bisweilen einer Entfernung überschüssiger Reagenzien vor der Analyse, z.B. unter Einsatz von Heptylamin, bedürfen (Kirschbaum et al. 1994, Kisby et al. 1988, Eriksson et al. 2009). Indes wurden Schwierigkeiten bezüglich der quantitativen Bestimmung des derivatisierten BMAs eingestanden (Eriksson et al. 2009). Auch fehlen exakte Daten zur Validierung der Methoden bezüglich der Präzision und Wiederfindungsrate. Eine besondere Rolle in der quantitativen Analytik von BMAA kommt der Probenaufbereitung zur Differenzierung des freien und proteingebundenen BMAs zu.

Tab. 5 Wissenschaftliche Kontroverse über das Vorkommen von BMAA in Cyanobakterien

Cyanobakterium (Anzahl positiver / Anzahl untersuchter Strains)	Herkunft	Habitat	freies BMAA µg/g	protein- gebundenes BMAA µg/g	Analyseverfahren	Referenz
<i>Nostoc</i> sp. (1/1)	Guam	Symbiose an <i>Cycas</i> -Wurzeln	0,3	nicht analysiert (n. a.)	Extraktion mit 0,1 M TCA, Derivatisierung mit AQC, LC-MS (C18-Säule)	Cox et al. 2003
<i>Nostoc</i> sp. (8/11)	divers	Symbiose mit <i>Cycas</i> , <i>Gunnera</i> , <i>Peltigera</i> etc.	0-203	0-1671		
<i>Nostoc</i> sp. (4/4)	Ostsee, Israel, USA	limnisch, brackisch, marin	27-1243	0-1772		
<i>Microcystis</i> sp. (2/2)	Niederlande, GB	limnisch	4-6	6-12		
<i>Prochlorococcus marinus</i> (1/1)	Atlantik	marin	32	57		
<i>Synechocystis</i> (0/1)	USA	limnisch	n. d.	n. d.		
<i>Synechococcus</i> (1/1)	USA	limnisch	25	n. d.		
<i>Chroococidiopsis indica</i> (2/2)	unbekannt	marin	435-1306	76-5415		
<i>Myxosarcina</i> sp. (2/2)	Mikronesien	marin	79-1501	960-1943	0,1 M TCA-Proteinfällung, Hydrolyse: 6M HCl, 110°C, 24 h, Derivatisierung mit AQC, HPLC-FLD (C18-Säule), Absicherung mit LC-MS (LOD = 65 µmol / Injektion)	Cox et al. 2005
<i>Lyngbya majuscula</i> (1/1)	Sansibar	marin	32	4		
<i>Planktothrix agardhii</i> (1/1)	Nordirland	limnisch	318	30		
<i>Plectonema</i> (1/1)	unbekannt	unbekannt	155	150		
<i>Phormidium</i> (1/1)	unbekannt	unbekannt	11	270		
<i>Symploca</i> (1/1)	GB	marin, intertidal	3	262		
<i>Trichodesmium</i> (2/2)	Karibik, Atlantik	marin, litoral	13-145	8-17		
<i>Anabaena</i> spp. (2/2)	USA	limnisch	32-35	n. d.		
<i>Aphanizomenon f.-a.</i> (1/1)	Ostsee	brackisch	n. d.	866		
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (1/1)	Australien	limnisch	6478	14		
<i>Nodularia</i> spp. (2/2)	Ostsee	brackisch	16-20	11-50		
<i>Calothrix</i> sp. (1/1)	unbekannt	unbekannt	13	92		
<i>Chlorogloeopsis</i> sp. (1/1)	Indien	terrestrisch	758	n. d.		
<i>Fischerella</i> sp. (1/1)	USA	Thermalquelle	44	175		
<i>Scytonema</i> sp. (1/1)	Bermuda	Kalkhöhle	n. d.	1733		
<i>Nodularia spumigena</i> (1/1)	Ostsee	brackisch	n. d.	n. a.	Extraktion mit 0,1 M TFA, Derivatisierung mit Fmoc und Heptylamin, LC-MS (C8-Säule) (LOD < 50 µg g ⁻¹)	unveröffentlichte Daten, LS LM-Chemie FSU Jena, 2005
<i>Nodularia harveyana</i> (1/1)	Ostsee	brackisch	n. d.	n. a.		
<i>Spirulina</i> , Nahrungsergänzungsmittel (2/2)	unbekannt	unbekannt	26,3-57,9	n. a.		
<i>Nostoc</i> sp. (1/1)	Hawaii (USA)	marin	7	3	0,1 M TCA-Proteinfällung, Hydrolyse: 6M HCl, 110°C, 16 h Derivatisierung mit AQC, HPLC-FLD, UPLC-UV, Amino-Acid-Analyzer, LC-MS, LC-MS/MS (C18-Säule) (LOD = 0,1 pmol / Injektion)	Banack et al. 2007
<i>Microcystis aeruginosa</i> N-88 (0/1)	Japan	limnisch	n. d.	n. a.	Extraktion mit 0,1M HCl, Anreicherung mittels Kationenaustauscher(SCX)-SPE, HILIC-MS (TSK-gel Amide-80) ohne Derivatisierung (LOD < 0,5 ng / Injektion)	Kubo et al. 2008
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> CRJ-1 (0/1)	Japan	limnisch	n. d.	n. a.		
<i>Nostoc commune</i> (21/21)	Peru	limnisch	2,04-21,51		Hydrolyse: 6M HCl, 110°C, 16 h Derivatisierung mit AQC, HPLC-FLD, UPLC-MS, LC-MS/MS (LOD = 65 pmol / Injektion)	Johnson et al. 2008
unbenannte Strains aus Kultursammlung, u.a. <i>Calothrix</i> (0/30)	unbekannt	unbekannt	n. d.	n. d.	0,1 M TCA, 70/30 ACN/H ₂ O oder 50/50 MeOH/H ₂ O, Hydrolyse: 6M HCl, 110°C, 17 h, (ZIC)HILIC-MS/MS ohne Derivatisierung (LOD = 1 µg g ⁻¹ bzw. 4 µg g ⁻¹ für freies bzw. proteingebundenes BMAA)	Rosén & Hellenäs 2008
unbenannte cyanobakterielle Blüten (0/4)	Ostsee	brackisch	n. d.	n. d.		
<i>Spirulina platensis</i> (0/2)	unbekannt	unbekannt	n. d.	n. d.		
<i>Microcystis</i> (2/2)			n. d.	1,1-188,34		
<i>Synechococcus</i> (1/1)			0	3,85		
<i>Synechocystis</i> (1/1)			0,23	5,17		
<i>Cyanodictyon</i> (1/1)			2,28	n. a.		
<i>Leptolyngbya</i> (5/5)			0-65,42	0,10-9,69		
<i>Limnithrix</i> (1/1)			0	2,05		
<i>Oscillatoria</i> (6/6)	Südafrika	limnisch	0-146,88	0-2755,6	Extraktion mit 0,1 M TCA, Hydrolyse mit 6 M HCl und 2 % Thioglycolsäure bei 110°C, 24 h, Derivatisierung mit Phenomenex EZ:faast TM , GC-MS (LOD = 4,2 pmol / Injektion)	Esterhuizen & Downing 2008
<i>Phormidium</i> (1/1)			0	14,91		
<i>Planktothrix</i> (3/3)			0-2,04	0-7,14		
<i>Pseudoanabaena</i> (3/3)			0-5,07	2,35-8,99		
<i>Anabaena</i> (1/2)			n. d.	0-0,56		
<i>Calothrix</i> (1/1)			1	n. d.		
<i>Microcystis</i> (3/3)			131-231	11-15		
<i>Aphanizomenon</i> (2/2)		Blüten, limnisch,	2	6		
<i>Oscillatoria</i> (2/2)		teilweise	14-35	26-43		
<i>Planktothrix</i> (1/1)	GB	Trinkwasser-Reservoir	276	11	0,1 M TCA-Proteinfällung, Hydrolyse: 6M HCl, 110°C, 16 h, Derivatisierung mit AQC, HPLC-FLD (C18-Säule), (LOD = 65 pmol bzw. 7,7 ng / Injektion)	Metcalfe et al. 2008
<i>Pseudoanabaena</i> (1/1)			n. d.	48		
<i>Anabaena</i> (2/2)			0-56	39-46		
<i>Nodularia</i> (1/1)			47	28		
nicht-spezifizierte Cyanobakterien	Australien	unbekannt	n. d.	n. d.	Extraktion, Hydrolyse und Derivatisierung mit Phenomenex EZ:faast TM , LC-MS (LOD = 1 µg / Injektion)	Wickramasinghe et al. 2008
nicht-spezifizierte Cyanobakterien-Blüten	Brasilien	limnisch	n. d.	n. a.	Extraktion mittels SPE, ¹ H NMR (LOD = 5 µg ml ⁻¹ Wasser; 1,161 µg g ⁻¹ <i>Cycas</i> -Samen)	Moura et al. 2009

Fortsetzung Tab 5 Wissenschaftliche Kontroverse über das Vorkommen von BMAA in Cyanobakterien

Cyanobakterium (Anzahl positiver / Anzahl untersuchter Strains)	Herkunft	Habitat	freies BMAA µg/g	protein- gebundenes BMAA µg/g	Analyseverfahren	Referenz
<i>Leptolyngbya</i> = <i>Plectonema</i> (1/1)	unbekannt	unbekannt	ca. 120		Extraktion mit 70/30 MeOH/H ₂ O, Protein- Präzipitation mit Aceton, Hydrolyse: 6M HCl, 110°C, 24 h, Derivatisierung mit AQC, HPLC-FLD (C18-Säule) (LOD = 120 fmol / Injektion)	Eriksson et al. 2009
<i>Nostoc</i> (1/1)	China	limnisch	<0,07 pmol je Injektion		0,1 M TCA-Proteinfällung, Hydrolyse: 6M HCl, 110°C, 24 h, Anreicherung mittels Kationen- austauscher(SCX)-SPE, HPLC-FLD (C18-Säule), außerdem: HILIC-MS/MS ohne Derivatisierung und ohne Nachweis von BMAA	Li et al. 2009 (in press)
<i>Microcystis</i> (0/2)	China	limnisch	n.d.	n.d.		

Durch die komplexe Probenmatrix kann es zu Interferenzen in der Detektion des Neurotoxins kommen. Durch Nutzung einer Präzipitation mit eiskaltem Aceton anstelle der etablierten Proteinfällung mit 0,1 M Trichloressigsäure (TCA) konnten Interferenzen, verursacht durch die Beeinflussung der Pufferkapazität während der Derivatisierung, minimiert werden. Unabhängig davon wurde eine optimale Proteinkonzentration von 0,06-0,15 µg µl⁻¹ für die Derivatisierung mit AQC ermittelt (Eriksson et al. 2009). Nach Extraktion des freien BMAs muss das präzipitierte Protein zur Bestimmung des gebundenen BMAs einer sauren Hydrolyse mit 6 M Salzsäure (HCl) bei 110 °C für 16-24 h unterzogen werden. Zur selektiven Detektion von BMAA in Cyanobakterien scheinen derivatisierungsfreie HILIC-MS/MS-Methoden die leistungsfähigsten zu sein. Insbesondere die von Rosén und Hellenäs (2008) validierte Methode wäre geeignet, zu gesicherten Aussagen über das Vorkommen von BMAA in Cyanobakterien zu gelangen. Bisher wurde mit keiner Methode ohne Derivatisierung BMAA in Cyanobakterien nachgewiesen, jedoch könnte nach einer erneuten Analyse der von Cox. et al. (2005) untersuchten Proben die kontrovers geführte Diskussion mit präzisen Ergebnissen beendet werden.

Die chromatografische Trennung mittels hydrophiler Interaktion kann im Vergleich zur Umkehrphasenchromatografie eine bessere Separationseffizienz entfalten (Kubo et al. 2008). Demgegenüber eröffneten Armstrong et al. (2007) eine Alternative zur HILIC-Trennung durch die Verwendung MS-gängiger Ionenpaarreagenzien; insbesondere mit Tridecafluorheptansäure (TDFHA) gelang eine effiziente Trennung gefolgt von einer selektiven Detektion für 25 underivatisierte Aminosäuren. Moura et al. (2009) entwickelten eine hochspezifische quantitative ¹H NMR-Methode zur Bestimmung von *L*-BMAA in Wasserproben und Cyanobakterien nach SPE-Konzentrierung mit einem starken Kationenaustauscher, in Anlehnung an die Festphasenextraktion von BMAA nach Kubo et al. (2008).

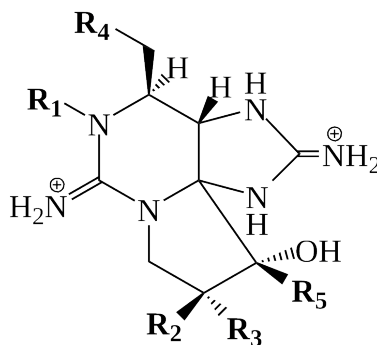
Der eindeutige Nachweis von BMAA in Cyanobakterien würde weitere Fragen aufwerfen. So wiesen Cox et al. (2005) u. a. auch in *Trichodesmium*, einem marinen Cyanobakterium,

das während eines Massenvorkommens tausende Quadratkilometer der Ozeane bedecken kann (Subramaniam et al. 2002), BMAA nach *Trichodesmium* zeigte hohe Neurotoxizitäten in Mäusen, obgleich keines der bekannten cyanobakteriellen Neurotoxine (Anatoxin-a, Anatoxin-a(s), PSP) nachgewiesen werden konnte, so dass die Ursache bisher ungeklärt ist (Hawser et al. 1991). Das Vorkommen von BMAA (Cox et al. 2005) oder DAB könnte eine mögliche Erklärung darstellen. Auch legt das ubiquitäre Vorkommen von Cyanobakterien in unterschiedlichsten Habitaten eine menschliche Exposition nahe, die nicht nur die Region von Guam betreffe, sondern globale Signifikanz bezüglich der Ätiologie neurodegenerativer Erkrankungen des Menschen beanspruche. Allerdings bliebe fraglich, ob Konzentrationen erreicht werden, die eine Neurotoxizität induzieren und inwiefern eine niedrigschwellige Exposition, in Kombination mit einer genetischen Prädisposition, zur Ausbildung neurologischer Dysfunktionen führen kann (Lobner et al. 2007). Das Verhältnis zwischen freiem und proteingebundem BMAA zeigte keine quantitative Korrelation (Cox et al. 2005, Esterhuizen & Downing 2008), wobei die Freisetzungsrates der proteingebundenen Aminosäure in exponierten Organismen im Kontext toxikologischer Fragestellungen sowie die Variation des BMAA-Vorkommens unter dem Einfluss der Wachstumsbedingungen und des Lebenszyklus der Cyanobakterien interessierte. Auch wären zukünftig mögliche kumulative toxische Effekte bei einer Koexistenz von BMAA mit anderen cyanobakteriellen Toxinen zu eruieren, wie sie im Zusammenhang mit MCs, NODs, ANA und PSP-Toxinen in cyanobakteriell kontaminierten Wasserproben beschrieben wurden (Metcalf et al. 2008). Dabei stellt die Entwicklung leistungsfähiger Analysenverfahren für eine eindeutige Identifikation und Quantifizierung von BMAA und DAB in biotischen und abiotischen Umweltproben die Grundlage für die Abschätzung potentieller Risiken durch eine Exposition mit BMAA und DAB dar, und von besonderer Relevanz ist hierbei die Kontrolle der Trinkwasserqualität sowie die Überwachung von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis hinsichtlich einer Kontamination mit cyanobakteriellen Toxinen.

2.2.4 Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) - Toxine

PSP-Toxine gehören zu den Alkaloiden, bestehend aus einem Tetrahydropurin-Grundgerüst und zwei positiv geladene Guanidinogruppen. Die bisher dokumentierten Strukturvarianten leiten sich vom Saxitoxin (STX) und seinem 1-Hydroxy-Derivat Neosaxitoxin (NEO) durch Substitutionen an 5 verschiedenen Positionen (R1-R5) ab (Abb. 9, Tab. 6).

Abb. 9 Allgemeine chemische Struktur der PSP-Toxine



Tab. 6 Übersicht der bisher beschriebenen PSP-Toxine

Nr. PSP-Toxin	Gruppe	[M+H] ⁺	R1	R2	R3	R4	R5	Toxizitätsfaktor (LD50 in µg/kg)	Vorkommen in Cyanobakterien (Literatur)
1 STX		300	H	H	H	H ₂ N-COO	OH	1,0 (10)	<i>L. wollei</i> (Carmichael et al. 1997), <i>Aph. f.-a.</i> (Mahmood & Carmichael 1986), <i>C. raciborskii</i> (Lagos et al. 1999), <i>Ana. circinalis</i> (Humpage et al. 1994, Negri & Jones 1995), <i>Ana. lemmermannii</i> (Rapala et al. 2005), <i>Aph. gracile</i> (Pereira et al. 2004), <i>Planktothrix</i> sp. (Pomati et al. 2000)
2 NEO		316	OH	H	H	H ₂ N-COO	OH	1,0 (65)	<i>Aph. f.-a.</i> (Mahmood & Carmichael 1986), <i>C. raciborskii</i> (Lagos et al. 1999), <i>Aph. gracile</i> (Pereira et al. 2004)
3 GTX1	Carbamoyltoxine	412	OH	H	OSO ₃ ⁻	H ₂ N-COO	OH	1,0 (k.A.)	<i>C. raciborskii</i> (Lagos et al. 1999), <i>Aph. f.-a.</i> (Rippka et al. 1979), <i>Ana. circinalis</i> (Deeds et al. 2008)
4 GTX2		396	H	H	OSO ₃ ⁻	H ₂ N-COO	OH	0,4 (k.A.)	<i>Ana. circinalis</i> (Humpage et al. 1994, Negri & Jones 1995), <i>Rivularia</i> sp. (Bravo et al. 1996), <i>C. raciborskii</i> (Molica et al. 2002)
5 GTX3		396	H	OSO ₃ ⁻	H	H ₂ N-COO	OH	0,6 (k.A.)	<i>Ana. circinalis</i> (Humpage et al. 1994, Negri & Jones 1995), <i>Aph. f.-a.</i> (Ferreira et al. 2001), <i>C. raciborskii</i> (Molica et al. 2002)
6 GTX4		412	OH	OSO ₃ ⁻	H	H ₂ N-COO	OH	0,7 (k.A.)	<i>Aph. f.-a.</i> (Ferreira et al. 2001), <i>Rivularia</i> sp. (Bravo et al. 1996), <i>Ana. circinalis</i> (Deeds et al. 2008)
7 GTX5/ B1		380	H	H	H	SO ₃ -NH-COO	OH	0,1 (k.A.)	<i>Aph. f.-a.</i> (Mahmood & Carmichael 1986), <i>Ana. circinalis</i> (Humpage et al. 1994, Negri & Jones 1995)
8 GTX6/ B2	N-Sulfocarbamoyltoxine	396	OH	H	H	SO ₃ -NH-COO	OH	0,1 (k.A.)	<i>Lyngbya wollei</i> (Onodera et al. 1997b)
9 C1		476	H	H	OSO ₃ ⁻	SO ₃ -NH-COO	OH	<0,1 (k.A.)	<i>Ana. circinalis</i> (Humpage et al. 1994, Negri & Jones 1995)
10 C2		476	H	OSO ₃ ⁻	H	SO ₃ -NH-COO	OH	0,1 (k.A.)	<i>Ana. circinalis</i> (Humpage et al. 1994, Negri & Jones 1995)
11 C3		492	OH	H	OSO ₃ ⁻	SO ₃ -NH-COO	OH	<0,1 (k.A.)	bisher nur in Dinoflagellaten beschrieben: z.B. <i>Alexandrium ostenfeldii</i> (Ravn et al. 1995)
12 C4		492	OH	OSO ₃ ⁻	H	SO ₃ -NH-COO	OH	0,1 (k.A.)	
13 dcSTX		257	H	H	H	OH	OH	1,0 (k.A.)	<i>L. wollei</i> (Onodera et al. 1997b), <i>Aph. f.-a.</i> (Mahmood & Carmichael 1986), <i>Ana. circinalis</i> (Humpage et al. 1994, Negri & Jones 1995)
14 dcNEO		273	OH	H	H	OH	OH	0,4 (k.A.)	bisher nicht in Cyanobakterien beschrieben: Anreicherung in Schalentieren durch marine Dinoflagellaten (Deeds et al. 2008)
15 dcGTX1	Decarbamoyltoxine	369	OH	H	OSO ₃ ⁻	OH	OH	0,5 (k.A.)	
16 dcGTX2		353	H	H	OSO ₃ ⁻	OH	OH	0,2 (k.A.)	
17 dcGTX3		353	H	OSO ₃ ⁻	H	OH	OH	0,4 (k.A.)	<i>L. wollei</i> (Onodera et al. 1997b), <i>Aph. f.-a.</i> (Mahmood & Carmichael 1986), <i>Ana. circinalis</i> (Humpage et al. 1994, Negri & Jones 1995)
18 dcGTX4		369	OH	OSO ₃ ⁻	H	OH	OH	0,5 (k.A.)	bisher nicht in Cyanobakterien beschrieben: Anreicherung in Schalentieren durch marine Dinoflagellaten (Deeds et al. 2008)
19 doSTX		241	H	H	H	H	OH	k.A. (k.A.)	bisher nicht in Cyanobakterien beschrieben: Anreicherung in Schalentieren durch Dinoflagellaten (Oshima et al. 1990, 1993)
20 doNEO	Deoxydecarbamoyltoxine	257	H	H	H	H	OH	k.A. (k.A.)	bisher nicht in Cyanobakterien beschrieben: Schalentiere (Abouabdellah et al. 2008, Deeds et al. 2008)
21 doGTX1		353	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	OH	k.A. (k.A.)	
22 doGTX2		237	H	H	OSO ₃ ⁻	H	OH	k.A. (k.A.)	bisher nur in Dinoflagellaten beschrieben: <i>Gymnodinium catenatum</i> (Oshima et al. 1993)
23 doGTX3		237	H	OSO ₃ ⁻	H	H	OH	k.A. (k.A.)	
24 LWTX1	<i>Lyngbya wollei</i> Toxine (vorrangig Acetyltoxine)	379	H	H	OSO ₃ ⁻	CH ₃ -COO	H	k.A. (k.A.)	
25 LWTX2		395	H	H	OSO ₃ ⁻	CH ₃ -COO	OH	k.A. (k.A.)	
26 LWTX3		395	H	OSO ₃ ⁻	H	CH ₃ -COO	OH	k.A. (k.A.)	
27 LWTX4		241	H	H	H	OH	H	k.A. (k.A.)	<i>Lyngbya wollei</i> (Onodera et al. 1997b)
28 LWTX5		299	H	H	H	CH ₃ -COO	OH	k.A. (k.A.)	
29 LWTX6		283	H	H	H	CH ₃ -COO	H	k.A. (k.A.)	
30 GC1	Hydroxybenzoyltoxine	473	H	H	OSO ₃ ⁻	HO-C ₆ H ₄ -COO	OH	k.A. (k.A.)	
31 GC2		473	H	OSO ₃ ⁻	H	HO-C ₆ H ₄ -COO	OH	k.A. (k.A.)	bisher nur in Dinoflagellaten beschrieben: <i>Gymnodinium catenatum</i> (Negri et al. 2003, Llewellyn et al. 2004)
32 GC3		377	H	H	H	HO-C ₆ H ₄ -COO	OH	k.A. (k.A.)	

Entsprechend ihrer Substituenten werden die PSP-Toxine in Carbamoyltoxine (STX, NEO, Gonyautoxin 1-4 = GTX1-4), N-Sulfocarbamoyltoxine (Gonyautoxin 5-6 = GTX5-6 = B1-2, C1-4), Decarbamoyltoxine (Decarbamoylsaxitoxin = dcSTX, Decarbamoylneosaxitoxin = dcNEO, Decarbamoylgonyautoxin 1-4 = dcGTX1-4) und Deoxydecarbamoyltoxine (Deoxydecarbamoylsaxitoxin = doSTX, Deoxydecarbamoylgonyautoxin 2-3 = doGTX2-3) eingeteilt (Luckas et al. 2003). Überdies werden Toxine aus *Lyngbya wollei* (LWTX1-6, vorrangig Acetyltoxine) und *Gymnodinium catenatum* (GC1-3, Hydroxybenzoyltoxine) nach ihrem Vorkommen in eigenen Gruppen zusammengefasst. PSP-Toxine stellen eine Besonderheit dar, weil diese sowohl durch Cyanobakterien

(Prokaryoten) als auch durch marine Dinoflagellaten (Eukaryoten) wie z.B. *Alexandrium* spp. und *Gymnodinium catenatum* produziert werden können. *Bivalvia* filtern das Phytoplankton vermöge ihrer Kiemen und können daher ebenfalls PSP-Toxine anreichern, so dass der Verzehr von Muscheln eine mögliche Expositionsquelle für diese Toxine darstellt. Diese Problematik berücksichtigt die EU-Verordnung 853/2004, die ein Verkehrsverbot für lebende Muscheln und daraus hergestellte Fischereierzeugnisse vorsieht, falls mehr als 800 µg PSP-Toxine je kg Muschelfleisch nachweisbar sind.

Die paralytische Wirkung der PSP-Toxine beruht auf dem neurotoxischen Mechanismus einer Verhinderung von Aktionspotentialen durch die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle (Strichartz et al. 1986). Dabei hängt die Toxizität der jeweiligen PSP-Toxine maßgeblich von den Substituenten im Molekül ab, welche die spezifische Bindung an den Natriumkanäle beeinflussen (Hall & Reichardt 1984, Schantz 1986). STX und NEO haben als nicht-sulfatierte Carbamoyltoxine die höchste Toxizität. Die geringste Toxizität weisen die 2-fach sulfatierten C-Toxine auf (Wright 1995). Die Gesamtoxizität eines Gemisches von PSP-Toxinen wird mit Hilfe von Toxizitätsfaktoren (Tab. 6) der Einzelttoxizitäten bestimmt (EFSA 2009).

Da PSP-Toxine weder Fluoreszenz- noch UV-Aktivität aufweisen, gelingt ihre Detektion nach HPLC-Trennung nur über eine Detektion nach Oxidation, d.h. durch eine Nachsäulenderivatisierung zur Bildung fluoreszierender Pyrimidopurine (Bates & Rapoport 1975). Die Nachsäulenderivatisierung hat den Vorteil, dass unterschiedliche Oxidationsprodukte eines PSP-Toxins nach abgeschlossener chromatografischer Trennung nur einen Peak ergeben (Luckas 1992). Die flüssigchromatografische Trennung der hydrophilen PSP-Toxine wurde erstmals unter Modifikation der mobilen Phase mit Ionenpaarbildnern (v.a. Alkylsulfonsäuren) ermöglicht. Während die Verwendung von Hexan- und Heptansulfonsäure in einer Koelution der unterschiedlich toxischen PSP-Toxine STX und dcSTX resultierte (Sullivan & Wekell 1984), ermöglichte der Einsatz von Octansulfonsäure in Kombination mit einer 2-Stufen-Elution die Trennung der Carbamoyl-, N-Sulfocarbamoyl- und Decarbamoyl-toxine unter Koelution von GTX1/4 (Thielert et al. 1991). Erst die Kombination von Heptan- und Octansulfonsäure ermöglichte die chromatografische Trennung aller PSP-Toxine an einer RP-C18-Phase (Diener et al. 2006). Demgegenüber sieht die *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) die Analysenmethode 2005.06 nach Lawrence & Menard (1991) vor, welche zahlreiche Koelutionen (GTX1/4, GTX2/3, C1/2 und C3/4) impliziert (Lawrence et al. 2005).

Die massenspektrometrische Bestimmung setzt bei einer chromatografischen Trennung im RP-Modus leicht flüchtige Ionenpaarbildner (z.B. fluoriierte Carbonsäuren) voraus, so dass Alkylsulfonsäuren ungeeignet sind. Die alternative Verwendung von Kationenaustauschern verminderte die Ionsierungseffizienz und erhöhte das Basislinienrauschen aufgrund hoher Konzentrationen an Ammoniumacetat (Jaime et al. 2001). Erst der Einsatz einer stationären HILIC-Phase mit einer mobilen Phase bestehend aus Wasser/Acetonitril sowie einem Ameisensäure/Ammoniumformiat-Puffer ermöglichte eine effiziente LC-MS(/MS)-Kopplung (Dell'Aversano et al. 2004, Diener et al. 2007). PSP-Toxine bilden unter Elektrospray-Ionisierung (ESI) vornehmlich $[M+H]^+$ -Ionen sowie Fragmentionen unter Abspaltung von Wasser. Die C-Toxine bilden überwiegend Ammoniumaddukte $[M+NH_4]^+$. Die Fragmentierung der GTXs, dcGTXs und C-Toxine ist primär durch die Bildung von $[M+H - SO_3]^+$ -Ionen gekennzeichnet (Dell'Aversano et al. 2005, Sleno et al. 2004 & 2005).

2.3 Expositionsquellen cyanobakterieller Toxine und rechtliche Regelungen zum Schutz der Gesundheit

Die erste Dokumentation einer Vergiftung durch cyanobakterielle Toxine stammt aus Australien. Zahlreiche Weiderinder starben durch eine Blüte von *Nodularia spumigena* (Francis 1878). Seither wurden zahlreiche Intoxikationen bei Menschen und Tieren beschrieben. In Deutschland kam es insbesondere an der Ostseeküste wiederholt zu tödlich verlaufenden Vergiftungen von Tieren durch von *N. spumigena* produzierte NODs. So starben 1963 auf Rügen etwa 400 Enten (Kalbe & Tiess 1964), während 1985 bei Stralsund zahlreiche Todesfälle in einer Rinderherde zu beklagen waren (Gussmann et al. 1985) und 2008 vereinzelt Hunde nach Spaziergängen am Strand verendeten (z.B. am Greifswalder Bodden).

Quellen einer menschlichen Exposition mit cyanobakteriellen Toxinen können insbesondere kontaminiertes und unzureichend aufbereitetes Trinkwasser, Nahrungsergänzungsmittel auf Mikroalgenbasis und aquatische Organismen mit nutritiver Bedeutung sein. Außerdem sind neben einer oralen Aufnahme weitere Expositionswege durch das Baden in belasteten Gewässern (Inhalation, Verschlucken, Haut- und Schleimhautkontakt) sowie durch Hämodialyse (intravenöse Exposition) möglich. Die Risikobewertung und Grenzwertableitung für cyanobakterielle Toxine beruht auf der Referenz durch Tierversuche unter Berücksichtigung von Extrapolations- und Unsicherheitsfaktoren, die zu einem Faktor 1000 führen. Dieser Faktor ergibt sich aus einem Faktor 10 für die Extrapolation vom Tier auf den Menschen, aus einem Faktor 10

für die Extrapolation vom Tierversuchsergebnis, das nur aus einem Teil des Lebenszyklus gewonnen wurde, auf die lebenslängliche Exposition sowie aus einem Faktor 10 für unterschiedliche Empfindlichkeiten von Individuen innerhalb einer Population (Wiedner et al. 2007).

2.3.1 Oberflächenwasser

Oberflächenwasser stellt eine besondere Expositionsquelle cyanobakterieller Toxine für Menschen und Tiere dar. Vor allem limnische Gewässer wie Seen, Talsperren und Kanäle aber auch die Ostsee sind von der massenhaften Vermehrung von Cyanobakterien betroffen. Oberflächenwasser kann die Grundlage für Trinkwasser darstellen sowie als Badegewässer oder als Brauchwasser in der Industrie und Landwirtschaft genutzt werden.

2.3.1.1 Trinkwasser

Trinkwasser stellt besondere Anforderungen an Qualität und Reinheit. In Deutschland regelt die „*Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch*“ (TrinkwV 2001) die Qualitätsanforderungen des Trinkwassers. Bei den mikrobiologischen Parametern ist gefordert, dass in 100 ml Trinkwasser keine *Escherichia coli*, Enterokokken oder coliforme Bakterien nachweisbar sein dürfen. Gleiches gilt für *Chlostridium perfringens*, falls das Trinkwasser aus Oberflächenwasser stammt. Außerdem darf die Gesamtkeimzahl 100 koloniebildende Einheiten (KbE) je Milliliter nicht überschreiten (TrinkwV 2001). Allerdings werden keine Grenzwerte für cyanobakterielle Toxine in der TrinkwV (2001) geregelt, da in Deutschland aufgrund des gemäßigten Klimas und der weitreichenden Nutzung von Grundwasser wenig Handlungsbedarf besteht. Der WHO-Richtwert schreibt jedoch 1 µg MC-LR-Äquivalente je Liter Trinkwasser gemäß ISO 20179 vor. Weltweit, besonders in tropischen und subtropischen Regionen, wurden zahlreiche Fälle von Vergiftungen mit cyanobakteriellen Toxinen beschrieben: Eine massive *Microcystis*-Blüte im *Ohio River* sowie im *Potomac River* (USA, 1931) führte zu Erkrankungen von mehr als 5000 Menschen, die ihr Trinkwasser aus den entsprechenden Flüssen bezogen. Dabei war die Behandlung des Trinkwassers mittels Präzipitation, Filtration und Chlorung nicht ausreichend, um die cyanobakteriellen Toxine zu entfernen (Tisdale 1931). Außerdem wurden in den USA 1968 (Schwimmer & Schwimmer 1968) und 1985 (Carmichael 1994) zahlreiche Fälle mit gastrointestinaler Symptomatik nach Exposition mit Cyanobakterien enthaltendem Trinkwasser dokumentiert. In Queensland (Australien, 1979) führte der Versuch einer Bekämpfung des massenhaften Vorkommens

von *Cylindrospermopsis raciborskii* in einer Trinkwasserquelle unter Verwendung von Kupfersulfat zur massiven Freisetzung von CYN und in der Folge zu 150 Fällen von Hepatoenteritis, die als „*Palm Island Mystery Disease*“ in die Geschichte eingingen (Byth 1980). Auch wurden in Armidale (Australien, 1981) in der Bevölkerung stark erhöhte Leberenzymaktivitäten gemessen, nachdem im Trinkwasser (Oberflächenwasser) ein vermehrtes Auftreten von *Microcystis spp.* nachgewiesen wurde (Falconer et al. 1983). Nach einer Überschwemmung der Itaparica Talsperre in Bahia (Brasilien, 1988) wurden etwa 2000 Fälle von Gastroenteritis dokumentiert, wobei 88 Todesfälle zu beklagen waren. Untersuchungen des Trinkwassers in der betroffenen Region bestätigten das massive Vorkommen toxischer Cyanobakterien wie *Microcystis* und *Anabaena* (Teixera et al. 1993). In Malmö (Schweden, 1994) wurde in einer Zuckerfabrik versehentlich eine Brauchwasserinstallation aus einem mit *Planktothrix agardhii* belasteten Fluss mit einer Trinkwasserleitung verschaltet. Nach einem Rückstau erkrankten 121 Menschen an Gastroenteritis aufgrund der oralen Exposition mit MCs (Anadotter et al. 2001). Auch wurde in China eine signifikant höhere Inzidenz für Leberkrebs in Regionen beobachtet, in denen das Trinkwasser aus cyanobakteriell belastetem Oberflächenwasser und nicht aus Grundwasser bezogen wurde (Yu 1995).

2.3.1.2 Badegewässer

Während der Sommermonate zieht es viele Menschen zum Baden in die Seen, Flüsse und Meere. Im Gegensatz zu Schwimm- und Badebecken partizipieren Badegewässer am natürlichen Wasserkreislauf und dienen als Habitate für zahlreiche Lebewesen. Im limnischen Bereich sowie im Brackwasser der Ostsee stellen cyanobakterielle Massenvermehrungen ein wiederkehrendes, meist spätsommerliches Phänomen dar. Expositionswege für Badende können das Verschlucken, die Inhalation und den direkten Hautkontakt mit cyanobakteriellen Toxinen umfassen. Daraus können sich vielfältige Symptome, wie Gastroenteritis, Atemwegserkrankungen, Bindehautentzündungen, Ohrenschmerzen, Dermatitis und Schleimhautreizungen ergeben (Kautek et al. 1993, Jakobi et al. 1996). Zum Schutz der Badenden vor Cyanobakterien-Toxinen gab das Umweltbundesamt (2003) eine Empfehlung heraus, wonach bei $>10 \mu\text{g l}^{-1}$ MCs Warnhinweise und bei $>100 \mu\text{g l}^{-1}$ MCs Badeverbote ausgesprochen werden sollen.

Sensorische Warnsignale wie Trübungen und Verfärbungen des Wassers sowie unangenehm empfundene Geruchsentwicklungen cyanobakterieller Blüten bewahren jedoch die meisten Menschen vor dem Kontakt mit belasteten Gewässern. Gleichwohl

wurden Fälle einer Exposition Badender mit cyanobakteriellen Toxinen dokumentiert: In Saskatchewan (Kanada, 1959) wurde - trotz verstorbener Tiere und Warnhinweisen - in mit *Microcystis sp.* und *Anabaena circinalis* belasteten Gewässern gebadet. Dabei erkrankten 13 Menschen an Gastroenteritis sowie Kopf- und Muskelschmerzen (Dillenberg & Dehnel 1960). Nach einem Schwimm- und Kanuttraining in einem Gewässer mit massenhaftem Vorkommen von *Microcystis spp.* erkrankten in England (1989) 10 Soldaten an einer Lungenentzündung durch Inhalation von MCs (Turner et al. 1990). Eine prospektive Studie in Australien zeigte die signifikante Zunahme gastrointestinaler und dermalen Symptome in Abhängigkeit von der Aufenthaltsdauer im Gewässer sowie von der Cyanobakterienzellichte (Pilotto et al. 1997).

2.3.2 Hämodialyse

In Washington D.C. (USA) erlitten 23 Dialysepatienten im Jahre 1975 einen endotoxischen Schock. Die Ursache war eine Kontamination des Dialysewassers aufgrund einer cyanobakteriellen Blüte in einem Trinkwasserreservoir (Hindman et al. 1975).

Im Februar 1996 erkrankten in Caruaru (Brasilien) 116 von 131 Nierenpatienten nach einer Dialysebehandlung, wobei 76 Menschen starben (Jochimsen et al. 1998, Azevedo et al. 2002). Die akute Hepatotoxizität äußerte sich in einem Symptomkatalog, der später als *Caruaru-Syndrom* bezeichnet wurde und mit Erbrechen, Durchfall und Sehstörungen sowie mit klinischen Symptomen wie Hepatomegalie, Ikterus, Hyperbilirubinämie, Hypertriglyzeridämie, Hämorrhagien und Nekrose einherging. Das Dialysewasser aus dem Tabocas-Reservoir (Pernambuco) enthielt MCs ($19,5 \mu\text{g l}^{-1}$) und CYN. Phytoplanktonuntersuchungen des Trinkwassers zeigten das Vorkommen von *Microcystis*, *Anabaena* und *Cylindrospermopsis*. Die interne Wasserbehandlung mittels Ionenaustausch- und Mikrofiltrationstechniken vermochte die Kontamination nicht zu verhindern. Dabei dürfte sich fatal ausgewirkt haben, dass keine Umkehrosmose zur Anwendung kam und die Exposition mit cyanobakteriellen Toxinen intravenös erfolgte (Ismail et al. 1996, Carmichael et al 2001).

2.3.3 Nahrungsergänzungsmittel auf Mikroalgenbasis

Die Nutzung von Cyanobakterien für die menschliche Ernährung hat insbesondere in China eine mehr als 2000-jährige Geschichte (Gao 1998). Kolonien terrestrischer *Nostoc commune* und *Nostoc flagelliforme* werden vielfältig serviert, z.B. in Form der traditionellen Suppe *fa cai* (Takenaka et al. 1998). Auch werden im Hochland von Peru

kugelförmige Kolonien von *Nostoc commune* von der indigenen Bevölkerung aus den Andenseen gesammelt und als *Lhullucha* verzehrt (Johnson et al. 2008). Außerdem wurden *Nostoc sp.* in Skandinavien als Nahrung und Medizin genutzt (Brüll et al. 2000). Im 14. Jahrhundert begann mit der Besiedlung des zentralmexikanischen Hochlandes durch die Azteken die Nutzung getrockneter *Spirulina sp.* aus dem Texcoco-See für ein Brot, das *Tecuitlatl* genannt wurde (Farrar 1966, Ciferri 1983). In Zentralafrika ernten noch heute ortsansässige Stämme Cyanobakterien, vornehmlich *Spirulina*, aus dem Tschadsee, welche zu harten grüngefärbten Keksen (*Dihé*) verarbeitet werden (Delpeuch et al. 1975, Ciferri 1983, Abdulqader et al. 2000).

Gegenwärtig avancieren Nahrungsergänzungsmittel auf Algenbasis vor allem unter Konsumenten mit einer Affinität für sogenannte „ökologische Naturkost“ zu marktrelevanten Produkten, die jedoch eine mögliche Expositionsquelle für cyanobakterielle Toxine in der menschlichen Ernährung darstellen. In Form von Tabletten, Kapseln oder Pulver werden insbesondere die Cyanobakterien *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima* und *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA-Alge) sowie die Grünalge *Chlorella sp.* als Waren mit propagiertem gesundheitlichem Nutzen feilgeboten. Ferner werden Mikroalgen zunehmend in kosmetischen und pharmazeutischen Produkten verarbeitet. Während *Spirulina* und *Chlorella* zumeist in Photobioreaktoranlagen oder offenen sogenannten *Raceways* kultiviert werden (Olaizola 2003, Ecke 2008), stammen AFA-Algenprodukte nahezu ausschließlich aus dem natürlichen Habitat des *Upper Lake Klamath* in Oregon, USA. Im Sektor *health food* werden jährlich über 3000 Tonnen *Spirulina*-Biomasse vor allem in den USA, Kanada, Japan und Europa verkauft (Reder 2003). Der natürlich eutrophierte *Lake Klamath* mit einer durchschnittlichen Tiefe von nur 4,2 m und einer Ausdehnung von 249,1 km² ermöglicht eine jährliche Produktion von etwa 500 Tonnen getrockneter AFA-Algen (Schaeffer et al. 1999). Im Phytoplankton des Sees ist die natürliche Koexistenz von potentiell toxinbildenden Cyanobakterienspezies nicht auszuschließen (Carmichael et al. 2000), so dass eine umfassende Lebensmittelüberwachung zum Schutz der Verbraucher unter besonderer Berücksichtigung cyanobakterieller Toxine geboten erscheint. Auch kann das Wachstum der Algen in den Nährmedien der Bioreaktoren unter nicht-axenischen Bedingungen mit anderen potentiell toxinproduzierenden Cyanobakterien assoziiert sein. Ein kritischer Faktor liegt in der kontaminationsfreien Isolation geeigneter Mikroalgenspezies aus nativen Habitaten zur Beimpfung der Photobioreaktoren. Außerdem besteht die Notwendigkeit einer permanenten Wasser- und Abwasserkontrolle im Zuge der Biomasseproduktion zur

Vermeidung von Kontaminationen. Allgemein kann postuliert werden, dass eine mögliche Exposition mit cyanobakteriellen Toxinen bei Nahrungsergänzungsmitteln auf *AFA*-Algenbasis wahrscheinlicher ist, wenn diese aus natürlichen Habitaten gewonnen werden. In diesem Kontext berichteten Sawyer et al. (1968) erstmals von der letalen Wirkung eines wässrigen Extrakts von *AFA*-Algen aus dem *Lake Klamath* auf Mäuse nach intraperitonealer Injektion. Seither wurden zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel auf Mikroalgenbasis auf das Vorkommen cyanobakterieller Toxine untersucht (Tab. 7). Der von Fawell et al. (1994) angeregte Grenzwert der *Oregon Health Division* (OHD) von $1 \mu\text{g g}^{-1}$ für MCs in Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis wurde in der Vergangenheit vielfach überschritten.

Am Lehrstuhl Lebensmittelchemie des Instituts für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurden im Zeitraum zwischen 1998 und 2009 im Rahmen der Routine-Analytik mittels LC-MS und LC-MS/MS insgesamt 74 Nahrungsergänzungsmittel auf das Vorkommen von cyanobakteriellen Toxinen (MCs, NOD, ANA, CYN, BMAA) getestet (davon 35 Proben vom Autor), die aus 13 *Chlorella*-Proben, 15 *AFA*-Algen, 34 *Spirulina*-Proben und 10 als Algenpräparate, -kapseln oder -tabletten nicht genau spezifizierter Zusammensetzung bestanden (Tab. 8). Für die toxikologische Bewertung von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis sollte aber auch beachtet werden, dass alle Cyanobakterien als gramnegative Bakterien thermostabile Lipopolysaccharide (LPS) produzieren, die als Endotoxine wirken, da die LPS erst nach Dekomposition der Zellmembranen freigesetzt werden (Stewart 2004). Während *Spirulina sp.* regelmäßig als nicht-toxisch beschrieben wurden (Mussagy et al. 2006), belegten Ballot et al. 2004 und 2005 das Vorkommen von MCs und ANA in reinen Kulturen von *Spirulina fusiformis*, einer Spezies, die auch in der Produktion von Nahrungsergänzungsmitteln zunehmend an Bedeutung gewinnt. Isawa et al. (2002) beschrieben in Japan den ersten Fall einer Hepatotoxizität von *Spirulina* an einem Patienten, der 2 Wochen lang ein Nahrungsergänzungsmittel auf Basis von *Spirulina* einnahm. Mazokopakis et al. (2008) berichteten von akuter Rhabdomyolysis (Lyse der Skelettmuskulatur) bei einem gesunden 28-jährigen Mann infolge der Einnahme eines Nahrungsergänzungsmittels auf der Basis von *Spirulina platensis*. Eine subchronische Toxizitätsstudie mit hohen Dosen *Spirulina maxima* zeigte hingegen keine adversen Effekte auf Mäuse (Salazar et al. 1998).

Tab. 7 Toxingehalte von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis

Anzahl (n) der Proben, sofern genannt (Mikroalgen)	identifizierte Toxine	Toxin-gehalt ($\mu\text{g/g}$)	Analyse-methoden	Anmerkungen	Literatur
6 (AFA-Algen)	MC-LR	11-24,7	HPLC, ELISA, PPIA	Messung nach 13 Jahren Lagerung bei Raumtemperatur, 100% > 1 $\mu\text{g g}^{-1}$	Schaeffer et al. 1999
15 (<i>Spirulina</i>)	MC-LR	0,15-2,12	ELISA	Studie des <i>Oregon Department of Agriculture</i> (ODA) zwischen Mai 1998 und Januar 1999, 14 von 15 Proben mit 0,15-0,52 $\mu\text{g g}^{-1}$ < 1 $\mu\text{g g}^{-1}$	Gilroy et al. 2000
87 (AFA-Algen)	MC-LR, MC-RR, MC-LA	0,04-18,4	HPLC, ELISA	Proben der 4 größten Hersteller (1996-1999), 85 Proben positiv, 63 Proben (72%) > 1 $\mu\text{g g}^{-1}$, MC-LR > 90%	Gilroy et al. 2000
(<i>Spirulina</i>)	EpoxyANA, DihydroHANA	0-19	LC-MS/MS	Nachweis eines neuen Isomers des EpoxyANA	Draisci et al. 2001
117 (AFA-Algen, <i>Spirulina</i> sp., unidentifizierte Algenspezies)	MC-LR, MC-LA	0,1-35	ELISA, PPIA, LC-MS/MS	Studie unter der Schirmherrschaft von <i>Health Canada</i> , AFA-Algen mit höchsten Toxingehalten, 50% > 1 $\mu\text{g g}^{-1}$	Lawrence et al. 2001
11 (<i>Spirulina</i> , <i>Chlorella</i>)	MC-LR	0,02-0,08	ELISA	8 von 11 positive Proben, sämtlich unter dem OHD-Grenzwert	Yu et al. 2002
11 (AFA-Algen, <i>Spirulina</i> , <i>Chlorella</i>)	MC-LR	0,01-5,3	ELISA, PPIA	Untersuchungen des Schweizer Bundesamtes für Gesundheit, AFA-Algen (7) mit höchsten Toxingehalten, <i>Chlorella</i> - (3) und <i>Spirulina</i> -Proben (1) mit 0,01-0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$	Engeli 2005
9 (<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i>)	keine MCs nachweisbar	n.d.	PPIA (PPI)	Testung auf MCs, LOD = 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$	Chen et al. 2005
12 (AFA-Algen)	MC-LR	0,1-4,73	ELISA, PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) zur Testung auf das Microcystin-Synthetase-Gencluster (<i>mcy</i>), 4 Proben > 1 $\mu\text{g g}^{-1}$, alle Proben positiv auf MCs sowie <i>mcyA</i> und <i>mcyE</i> getestet	Saker et al. 2005
20 („blue-green algae“)	MC-RR, dmMC-RR, MC-LR, MC-YR, MC-LA	0-4,5	ELISA, LC-MS/MS	Zwei desmethylierte Varianten von MC-RR wurden nach-gewiesen, ELISA zeigte geringere Gehalte als LC-MS/MS	Bruno et al. 2006
54 (AFA-Algen, <i>Spirulina</i> , <i>Chlorella</i>)	MC-LR, MC-RR, MC-YR	0-0,08	LC-MS/MS	41 <i>Spirulina</i> - und 5 <i>Chlorella</i> - Proben negativ, 5 von 8 AFA-Algen mit 0,05-0,08 $\mu\text{g g}^{-1}$ unter dem Grenzwert der OHD	CVUA (Chemisches Veterinäruntersuchungsamt) Sigmaringen 2005, 2006, 2007
36 (<i>Spirulina</i>)	MC-LR, MC-RR, MC-YR	0,002-0,163	LC-MS/MS	Produkte des chinesischen Marktes, MC-RR dominierend in über 90 % der Proben, alle Proben < 1 $\mu\text{g g}^{-1}$	Jiang et al. 2007
(AFA-Algen, <i>Spirulina</i>)	kein ANA und HANA nachweisbar	n.d.	HPLC-FLD, LC-MS/MS	Proben aus Kanada und Portugal, keine ANA-Metaboliten nachweisbar, ein Verdacht mittels HPLC-FLD hatte sich nach LC-MS/MS – Absicherung nicht bestätigt	Rawn et al. 2007
19 (<i>Spirulina</i> , AFA-Algen)	MC-LR, MC-LA	0-4,0	UPLC-MS (ESI-TOF)	Alle 10 untersuchten <i>Spirulina</i> -Proben MC-negativ, 6 von 9 AFA-Algen MC-positiv, MC-LR > 90%, LOD = 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$	Ortelli et al. 2008
74 (AFA-Algen, <i>Spirulina</i> , <i>Chlorella</i> , unidentifizierte Algenspezies)	MC-LR, MC-LA, BMAA	0-1,8 (MCs) 0-57,9 (BMAA)	LC-MS, LC-MS/MS, HPLC-UV, HPLC-FLD	alle 13 <i>Chlorella</i> -Proben negativ, alle <i>Spirulina</i> -Proben negativ auf MCs und Anatoxin-a getestet, in 2 Proben wurde 26,3 bzw. 57,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ BMAA getestet, 5 von 15 AFA-Algen enthielten 0,12-1,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ MCs	unveröffentlichte Daten des Lehrstuhls Lebensmittelchemie der FSU Jena im Rahmen der Routine-Analytik im Zeitraum von 1998-2009, siehe Tab. 8

Tab. 8 Routineanalytik von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis im Hinblick auf cyanobakterielle Toxine (1998-2009)

Mikroalge		Toxingehalte in µg g ⁻¹ Trockenmasse, (-) nicht analysiert, 0 nicht nachweisbar; *Grenzwertüberschreitung (> 1,0 µg g ⁻¹)										
Laborcode	Eingangsdatum	MC-LR	MC-RR	MC-YR	MC-LA	MC-LF	MC-LW	NOD	ANA	CYN	PSP	BMAA
Chlorella												
67 1098-1	05.10.1998	0	0	0	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)	(-)
67 1098-2	05.10.1998	0	0	0	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)	(-)
67 1098-3	05.10.1998	0	0	0	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)	(-)
68 1098-1	05.10.1998	0	0	0	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)	(-)
68 1098-2	05.10.1998	0	0	0	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)	(-)
68 1098-3	05.10.1998	0	0	0	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)	(-)
38 0807-2	22.08.2007	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15 0308-1	15.03.2008	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15 0308-2	15.03.2008	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
35 0808	25.08.2008	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
43 1108-1	12.11.2008	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
46 1208-3	03.12.2008	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13 1109-3	18.11.2009	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
Spirulina												
47 1204	08.12.2004	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)
16 0505-1	23.05.2005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	57,9
16 0505-2	23.05.2005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	26,3
05 0106	25.01.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
06 0206-1	06.02.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
06 0206-2	06.02.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
06 0206-3	06.02.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
12 0306-1	14.03.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
12 0306-2	14.03.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
12 0306-3	14.03.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
23 0506-1	25.05.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
23 0506-2	25.05.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
23 0506-3	25.05.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
23 0506-4	25.05.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
23 0506-5	25.05.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
23 0506-6	25.05.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
57 1006-1	27.10.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
57 1006-2	27.10.2006	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
22 0307	30.03.2007	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
27 0507-1	21.05.2007	0	0	0	(-)	(-)	(-)	0	0	(-)	(-)	(-)
27 0507-2	21.05.2007	0	0	0	(-)	(-)	(-)	0	0	(-)	(-)	(-)
27 0507-3	21.05.2007	0	0	0	(-)	(-)	(-)	0	0	(-)	(-)	(-)
38 0807-1	22.08.2007	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41 0907-1	11.09.2007	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41 0907-2	11.09.2007	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
080208	05.02.2008	0	0	0	(-)	(-)	(-)	0	0	(-)	(-)	(-)
18 0308	19.03.2008	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
20 0308	26.03.2008	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
43 1108-2	11.11.2008	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	57,9
43 1108-3	11.11.2008	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	26,3
46 1208-2	03.12.2008	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
05 0509	11.05.2009	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
13 1109-1	18.11.2009	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
13 1109-2	18.11.2009	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
AEA-Alge												
34 0702	30.07.2002	1,80*	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
57 0903	01.09.2003	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
13 0204	20.02.2004	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12 0405	07.04.2005	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
30 0706	07.07.2006	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31 0607	19.06.2007	1,05*	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36 0807	06.08.2007	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
38 0807-4	22.08.2007	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
06 0108	24.01.2008	0,92	0	0	0,07	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
16 0308	07.03.2008	0	0	0	(-)	(-)	(-)	0	0	(-)	0	(-)
42 1108	06.11.2008	0,18	0	0	0,11	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
44 1108	26.11.2008	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
46 1208-4	03.12.2008	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
12 1109	03.11.2009	0,12	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13 1109-4	18.11.2009	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
sonstige												
09 0305	07.03.2005	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20 0307	26.03.2007	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)
38 0807-3	22.08.2007	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
59 1107	06.11.2007	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
09 0208-1	07.02.2008	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
09 0208-2	07.02.2008	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21 0408	03.04.2008	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
32 0708	16.07.2008	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46 1208-1	03.12.2008	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
06 0509	13.05.2009	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
LOD		0,05 - 0,50					0,1	0,1 - 2		2	0,5	25 - 50

Wenngleich *Strains* von *Aphanizomenon flos-aquae* beschrieben wurden, die befähigt sind ANA (Carmichael 1992, Rapala et al. 1993, Bumke-Vogt et al. 1999), CYN (Preussel et al. 2006, Rücker et al. 2007, Brient et al. 2008) und STX (Jackim & Gentile 1968, Adelman et al. 1982, Ferreira et al. 2001, Mahmood & Carmichael 1986, Pereira et al. 2000, Liu et al. 2006) zu produzieren, scheint *Aphanizomenon flos-aquae* aus dem *Upper Lake Klamath* keine dieser Toxine nativ zu synthetisieren (Schaeffer et al. 1999). Auch Microcystine

wurden bisher nicht in *Aphanizomenon flos-aquae* sondern nur im phylogenetisch eng verwandten Cyanobakterium *Aphanizomenon ovalisporum* nachgewiesen (Gkelis et al. 2005), das außerdem CYN zu produzieren vermag (Banker et al. 1997, Shaw et al. 1999). Mitunter ist die Zuordnung diffizil, da das Cyanobakterium zumeist mit anderen MC-produzierenden Gattungen koexistiert. Auch gilt es zu bedenken, dass in Nahrungsergänzungsmitteln auf *AFA*-Algenbasis die Microcystinsynthetase-Gene *mcyA* und *-E* nachgewiesen wurden (Saker et al. 2005). Eine endgültige Einschätzung bleibt die Studie jedoch schuldig, da die eingesetzte sehr empfindliche PCR-Methode schon bei geringen Kontaminationen mit Fremd-DNA falsch-positive Resultate ergibt. Später entwickelten Saker et. al. (2007) eine Multiplex-PCR zur Detektion toxischer Cyanobakterien in Nahrungsergänzungsmitteln. Diese Methode ermöglicht die gleichzeitige Amplifikation und Detektion geeigneter Zielsequenzen von potentiell toxischen *Anabaena sp.*, *Microcystis sp.* und *Planktothrix sp.* mittels 3 Primerpaaren, inklusive einer Positivkontrolle, mit nur einer PCR-Reaktion.

Auf Basis der umfangreichen Studien von Gilroy et al. (2000) und Lawrence et al. (2001) warnten die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) und das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)⁹ insbesondere vor Algenprodukten aus *Aphanizomenon flos-aquae*, da zahlreiche der angepriesenen gesundheitsfördernden Effekte bisher nicht wissenschaftlich untermauert sind und deshalb gegen das Verbot irreführender Werbung verstoßen. Obwohl in zahlreichen Publikationen mögliche positive Wirkungen von *Aphanizomenon flos-aquae* und *Spirulina* auf den Stoffwechsel (Salazar et al. 1996, Chamorro et al. 1997, Parikh et al. 2001, Park et al. 2008) diskutiert werden, darunter entzündungshemmende (Belay et al. 1993), neuroprotektive (Bermejo-Bescós et al. 2008), renoprotektive (Kuriakose & Kurup 2008), antimikrobielle und antivirale (Hayashi et al. 1994), antioxidative und anticancerogene (Miranda et al. 1998, Hirata et al. 2000, Pinero Estrada et al. 2001, Kim & Park 2003, Benedetti et al. 2004), cholesterin- und lipidsenkende (Kato et al. 1984, Nakaya et al. 1988, Hosoyamada et al. 1991, De Rivera et al. 1993, Mani et al. 2000, Samuels et al. 2002, Nagaoka et al. 2005), immunmodulierende (Manoukian et al. 1998, Ishii et al. 1999, Mao et al. 2000, Jensen et al. 2001, Pugh & Pasco 2001, Pugh et al. 2001, Hart et al. 2007)

⁹ Das 1994 im Zuge der Auflösung des Bundesgesundheitsamtes gegründete Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) wurde im November 2002 wieder aufgelöst. Die Kompetenzen der Bundesbehörde wurden vorrangig an das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und teilweise an das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) übertragen. Beide Behörden sind dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) unterstellt.

sowie das Wachstum der Skelettmuskulatur anregende (Voltarelli & de Mello 2008) Effekte, werden die möglichen positiven Wirkungen zumeist durch isolierte Betrachtung einzelner benefizieller Komponenten der Mikroalgen überbewertet und die Ergebnisse weder im Rahmen des komplexen Nahrungsergänzungsmittels noch im Zusammenhang mit den mannigfaltigen Faktoren einer vielseitig kombinierten Ernährung interpretiert. Zudem beruht eine Vielzahl der Untersuchungsergebnisse auf Tierstudien, vor allem mit Nagern. Die Frage der Übertragbarkeit der Modellorganismen auf den Menschen wird im Kontext metabolischer und psychophysischer Differenzen, wesentlich geringerer Lebenszeiten und Reproduktionszyklen sowie verschiedener Umweltfaktoren nur unzureichend diskutiert. In der Folge reichen die grenzenlosen Heilsversprechungen von unspezifischen Wirkungen wie mehr Energie und Lebensfreude, über den Schutz vor zahlreichen Erkrankungen wie Osteoporose, Krebs, Aids und Alzheimer, bis hin zur Therapie von Allergien, Übergewicht, Hormonstörungen und Schwermetallbelastungen (Dittrich 2003). Derart beworbene Produkte sind den Arzneimitteln zuzuordnen (BgVV 2001, BgVV 2002, DGE 2002). Insofern keine Zulassung durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) bzw. durch die *European Medicines Agency* (EMA) vorliegt, gelten entsprechend beworbene Produkte als nicht verkehrsfähig. Seit Dezember 2006 bzw. Januar 2007 (revidierte Fassung) regelt die sogenannte *Health-Claims-Verordnung* (EG Nr. 1924/2006) den Sachverhalt gesundheitsbezogener Werbung unmittelbar in allen Mitgliedsstaaten der Europäischen Union. Danach sind ausschließlich Aussagen zulässig, die durch anerkannte wissenschaftliche Erkenntnisse nachgewiesen sind, folglich gilt ein Verbotssprinzip mit Erlaubnisvorbehalt. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) erstellt auf Basis nationaler *Claim*-Listen ein europäisches Gemeinschaftsregister über zulässige gesundheitsbezogene Angaben für Lebensmittel.

Ursprünglich wurde *Spirulina* als natürliche Quelle für den Ausgleich einer defizitären Zufuhr von Vitamin B12 bei Vegetariern und Veganern angepriesen, jedoch wiesen Watanabe et al. (2002) in *Spirulina*-Produkten die Dominanz von Pseudocobalaminen, d.h. inaktiver Corrinoiden nach, welche eine adäquate Cobalaminzufuhr sogar behindern. Außerdem wurden *AFA*-Algenprodukte nicht selten als Therapeutika für das Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) bei Kindern beworben. In diesem Kontext riet das BgVV ausdrücklich vom Verzehr von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis durch Kinder ab. Auch Erwachsenen wurde eine Konsumeinschränkung nahegelegt, da eine Gefährdung der Verbraucher durch das

potentielle Vorkommen cyanobakterieller Toxine nicht auszuschließen ist (BgVV 2002). Dietrich & Hoeger (2005) regen unter Berücksichtigung zahlreicher Grenzwertüberschreitungen bei Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis zur Entwicklung adaptierter Grenzwerte an, die eine adäquate Risikoabschätzung für Kinder berücksichtigen. Auch können mögliche Gesundheitsrisiken durch chronische Exposition geringerer Dosen MCs nicht ausgeschlossen werden, weil die Exkretion von MCs nach Aufnahme durch die Leber sehr langsam erfolgt (Robinson et al. 1991, Lin & Chu 1994, Solter et al. 1998). Allgemein ist zu erwarten, dass die MC-Exposition der Konsumenten von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis signifikant höher ist (Eisenbrand 2008). Verbraucher berichteten, dass sie bis zu 20 g Mikroalgenprodukte pro Tag konsumieren (Gilroy et al. 2000). Im *Upper Lake Klamath* wird *Aphanizomenon flos-aquae* ausschließlich während der Blüte-Saison geerntet, jedoch ganzjährig vertrieben. Kommt es zu MC-Kontaminationen der AFA-Algen, ist bei dauerhafter Einnahme eine Exposition über das gesamte Jahr hinweg anzunehmen. In diesem Zusammenhang ist die adäquate Produktanalyse in Verbindung mit einer systematischen Chargen-Charakterisierung die Grundlage einer verbesserten Produktsicherheit. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO 2003) legte für Microcystine (MCs) provisorisch eine tolerierbare tägliche Zufuhr (*tolerable daily intake*, TDI) von 0,04 µg MC-LR-Äquivalente je kg Körpergewicht und Tag fest. Entgegen dem Grenzwert der *Oregon Health Division* (OHD) von 1 µg MC-LR je g Nahrungsergänzungsmittel postulierten Schaeffer et al. (1999) einen Sicherheitswert von 10 µg MC-LR je g AFA-Algenprodukt basierend auf einem durchschnittlichen Verzehr von 2 g (1 Tablette) des Nahrungsergänzungsmittels. Die Autoren rechtfertigten den eruierten 10-fach höheren Wert gegenüber dem OHD-Grenzwert durch Matrixeffekte insbesondere des Flavonolignans Silymarin, das leberprotektive Wirkungen gegen Microcystine zu entfalten vermag und in AFA-Algen in Konzentrationen von 80-200 µg g⁻¹ vorkommt (Mereish & Solow 1990, Solow et al. 1990, Hermansky et al. 1991, Mereish et al. 1991).

2.3.4 Aquatische Organismen als menschliche Nahrungsquellen

Der Verzehr von Muscheln, Krebsen, Fischen oder entsprechenden Erzeugnissen dieser aquatischen Organismen kann eine Expositionsquelle für akkumulierte cyanobakterielle Toxine oder deren Metabolite darstellen. Diese sind jedoch im Gegensatz zu marinen Biotoxinen von untergeordneter Bedeutung, da Massenvorkommen toxischer Cyanobakterien in marinen Habitaten aufgrund ihrer geringeren Salztoleranz relativ selten auftreten. Unabhängig davon wurde in der „Verordnung über die hygienischen

Anforderungen an Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln“ (Fischhygiene-Verordnung, FischHV, 8. Juni 2008) ein Grenzwert für PSP-Toxine (STX-Äquivalente) von $800 \mu\text{g kg}^{-1}$ Muschelfleisch festgesetzt, der 2004 von der EU-Verordnung 853/2004 bestätigt wurde. Die EU-Verordnung 2074/2005 sieht den *Mouse Bioassay* als Referenzmethode für die Einhaltung der EU-Verordnung 853/2004 vor, die jedoch im Gegensatz zu amtlich anerkannten LC-MS-Verfahren explizit vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in der Stellungnahme Nr. 032/2005 vom 26. Mai 2005 als unzuverlässige Methode kritisiert wurde.

2.4 Einfluss von Kultivierungsfaktoren auf die Toxinproduktion von Cyanobakterien

Eine große Anzahl cyanobakterieller *Strains* wurde aus natürlichen Habitaten isoliert, in geeigneten Laborsammlungen mit (nicht-axenisch) und ohne (axenisch) biotischen Kontaminanten kultiviert und der wissenschaftlichen Forschung zugänglich gemacht. Die Laborbedingungen unterscheiden sich wesentlich von den Bedingungen des natürlichen Habitats aufgrund unterschiedlicher biotischer und abiotischer Faktoren. Während die Bedingungen der Kultivierung infolge ihrer Standardisierung (Nährstoffzusammensetzung des Mediums, Licht- und Temperaturregime, etc.) die Kontrollierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit verschiedener Wachstumsfaktoren gewährleisten, kann die Komplexität, Interaktion und Dynamik der beeinflussenden biotischen und abiotischen Faktoren in natürlichen Habitaten nur defizitär und modellhaft in Kultur nachgestellt werden. Insbesondere axenische Kulturen schließen den allelopathischen¹⁰ Einfluss biotischer Faktoren aus. Eine Vergleichbarkeit der Variation eines Wachstumsparameters kann nur unter der Konstanz aller relevanten Faktoren gewährleistet werden. In diesem Kontext gebietet insbesondere der Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Forschungsgruppen Vorsicht, weil den jeweiligen Experimenten keine identischen Laborbedingungen zugrunde liegen.

2.4.1 Einfluss abiotischer Faktoren

Die Toxinproduktion von Cyanobakterien kann durch abiotische Faktoren beeinflusst werden. Dazu gehören die Temperatur, die Lichtintensität, das circadiane Lichtregime (Tag/Nacht-Rhythmus), die Zusammensetzung der Nährstoffe und Spurenelemente sowie der pH-Wert des Mediums oder mechanische Reize (z.B. Schüttelkultur). Die optimalen

¹⁰ Allelopathie ist das biochemische Phänomen der Beeinflussung des Wachstums und der Entwicklung anderer Organismen durch Sekundärmetabolite der Pflanzen, Algen, Korallen, Bakterien oder Pilze.

Bedingungen können selbst zwischen verschiedenen *Strains* einer Spezies variieren. Zurückliegende Studien zeigten eine größere Kohärenz für den Einfluss der Temperatur (18-25°C) und der Lichtintensität ($\geq 25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) im Gegensatz zu Effekten unterschiedlicher Nährstoffkonzentrationen, insbesondere von Phosphor und Stickstoff, auf die optimale Produktion von Microcystinen und Anatoxin-a (Rapala et al. 1993, Rapala et al. 1997, Kaebernick & Neilan 2001). Die Lichtintensität hat einen Einfluss auf die Expression des Microcystinsynthetase-Genclusters (*mcy*) und stimuliert die MC-Produktion (Kaebernick et al. 2002). Die optimalen Wachstumsbedingungen müssen indes nicht den idealen Bedingungen für die Toxinproduktion entsprechen, z.B. zeigte die niedrigere von zwei untersuchten Temperaturen (19 und 25°C) für *Cylindrospermopsis raciborskii* C10 eine geringere Biomasseproduktion bei einer höheren PSP-Toxinproduktion sowie Unterschiede (kein dcSTX bei 19°C) im Toxinprofil (Castro et al. 2004). Der Einfluss verschiedener Phosphorgehalte auf die Toxinproduktion ergab zumeist keine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Cyanobakterien. Phosphorlimitierung führte zu höheren MC-Konzentrationen in *Microcystis aeruginosa* (Oh et al. 2000, Zhang et al. 2006), während *Anabaena* sp. bei hohen P-Gehalten von 5,5 mg l⁻¹ die höchsten MC-Konzentrationen aufwies (Rapala et al. 1997). Variable Phosphatkonzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Produktion von Anatoxin-a (Rapala et al. 1993).

Cyanobakterien, die zur Stickstofffixierung fähig sind, produzierten in N-freiem Medium mehr Anatoxin-a (Rapala et al. 1993), während nicht-stickstofffixierende Cyanobakterien eine hohe Stickstoffzufuhr zur Toxinproduktion benötigen (Utkilen & Gjølme 1995). Auch wurden höhere Anatoxin-a-Konzentrationen gemessen, wenn Natriumnitrat durch Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle ersetzt wurde (Gallon et al. 1990). Außerdem scheint ein Einfluss des N-Gehaltes (Ammonium als Stickstoffquelle) auf das Microcystinprofil möglich zu sein, denn es wurden höhere Gehalte an MC-LR gegenüber MC-RR bei N-Limitierung beobachtet, während sich das Verhältnis bei höheren N-Gehalten umkehrte (Zhang et al. 2006).

Der Einfluss der Spurenelemente zeigte die Notwendigkeit adäquater Zinkgehalte sowohl für ein optimales Wachstum als auch für eine hohe Microcystinproduktion von *Microcystis aeruginosa*, während Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni und Si in nicht-toxischen Konzentrationen die Toxinproduktion nicht beeinflussten. Eine Eisenlimitierung verminderte das Wachstum, stimulierte jedoch die MC-Produktion (Lukac & Aegerter 1993, Lyck et al. 1996), indes wurde auch über gegensätzliche Effekte berichtet (Utkilen & Gjølme 1995). Molekularbiologische Untersuchungen zeigten ebenfalls eine erhöhte *mcy*-Expression nach

Eisenlimitierung, die zur Steigerung der MC-Produktion führte (Martin-Luna et al. 2006a & 2006b, Sevilla et al. 2008).

Microcystis aeruginosa zeigte insbesondere bei hohen pH-Werten (9,5), 20-24°C und einer Lichtintensität von 145 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die höchste Toxizität (Van der Westhuizen & Eloff 1983 & 1985). Die Saxitoxin-Konzentrationen in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 stiegen mit zunehmendem pH-Wert (bis pH 10) des Mediums exponentiell an. Auch zeigten NaCl und der synthetische Natriumkanalblocker Lidocain eine Stimulation der Saxitoxin-Produktion (Pomati et al. 2004).

2.4.2 Einfluss biotischer Faktoren

In natürlichen Habitaten leben Cyanobakterien zusammen mit anderen Organismen, die das Wachstum der Blaualgen durch Sekretion von Sekundärmetaboliten fördern oder allelopathisch hemmen können. Weiterhin können cyanobakterielle Toxine als allelopathische Substanzen gegen kompetitive Organismen wirken (Kearns & Hunter 2000, Jang et al. 2007). In diesem Kontext ergab der Vergleich axenischer und nicht-axenischer Kulturen mögliche biotische Interaktionen, dabei zeigten 2 von 3 *Strains* des Cyanobakteriums *Oscillatoria agardhii* geringere MC-Konzentrationen in nicht-axenischen Kulturen (Sivonen 1990b). Demgegenüber zeigte die Kokultivierung mit anderen Cyanobakterien (Engelke et al. 2003), Grünalgen (Kearns & Hunter 2000), aquatischen Pflanzen (Jang et al. 2007) und Zooplankton (Jang et al. 2003) eine signifikante Zunahme der Toxinproduktion infolge einer Stressreaktion bzw. Abwehrstrategie. Die aquatische Pflanze *Lemna japonica* stimulierte die Toxinproduktion in *Microcystis aeruginosa* unter Inhibition des Wachstums (Jang et al. 2007). Die Kokultivierung der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mit *Anabaena flos-aquae* induzierte zunächst eine 5-fache Erhöhung des Gehaltes an Anatoxin-a, während dessen Konzentration in einer späteren Wachstumsphase rapide abnahm. Die Microcystinproduktion ist hochgradig abhängig von der Wachstumsphase der Cyanobakterien (Kearns & Hunter 2000). Außerdem ergab die Verwendung eines bereits zur Kultivierung von *Planktothrix agardhii* CYA29 genutzten Mediums eine Stimulation der Hepatotoxinproduktion in *Microcystis aeruginosa* und *Nodularia spumigena*, während das gebrauchte Medium von *M. aeruginosa* bzw. *N. spumigena* keine Effekte zeigte (Engelke et al. 2003). Mechanismen der biotischen Interaktion können vielfältig sein und im Hinblick auf die Stimulierung der Produktion diverser cyanobakterieller Toxine durch unterschiedliche Substanzen mannigfaltiger Organismen verschiedenartig wirken.

2.4.3 Bedeutung der Kryopreservation

Die zeitintensive Kultivierung von Cyanobakterien in Flüssigkulturen inspirierte zunehmend die Mitarbeiter großer Algenkultursammlungen, Cyanobakterien und andere Mikroalgen so zu konservieren, dass ein fortwährendes Überimpfen und Austauschen des Mediums in Perioden des bloßen Erhalts der Kulturen vermieden werden kann (Starr & Zeikus 1993). Das Risiko unbeabsichtigter Kontaminationen oder genetischer Veränderungen (Mutation, Selektion) sollte minimiert werden (Box 1988, Romo & Bécares 1992, Watanabe & Sawaguchi 1995). Allerdings durften die Zellen nach der Reaktivierung ihre Vitalität nicht einbüßen, um die Verfügbarkeit für experimentelle Forschungen bedarfsgerecht zu gewährleisten, denn nur dann stellt die Kryopreservation eine geeignete Methode der Konservierung von Cyanobakterien dar. Die Etablierung entsprechender Methoden erwies sich jedoch im Vergleich zur Kryopreservation anderer Bakterien als weitaus schwieriger, da die Zellgröße einen erheblichen Einfluss auf den Erfolg der Gefrierkonservierung hat. Während die Zellen anderer Prokaryoten bei einem Durchmesser von nur 1 µm als relativ groß angesehen werden müssen, können coccoidale cyanobakterielle Einzelzellen einen Durchmesser von 0,4 - 40 µm aufweisen, und manchmal kann der Durchmesser filamentöser Formen sogar bis zu 100 µm betragen (Demoulin & Janssen 1981). Im Hinblick auf eine Aufrechterhaltung der Vitalität der Organismen sind kleinere Zellen wesentlich resistenter gegenüber Gefrier-Tau-Zyklen (Day 2007). Methoden der Kryopreservation unterscheiden sich durch die verschiedenen Lagerungstemperaturen von -196°C (flüssiger Stickstoff) bis zu -70°C, Gefrier- und TauprozEDUREN, der Handhabung nach dem Auftauen der Zellen sowie durch einen unterschiedlichen Einsatz der Kryoprotektanten Methanol (2-12,5 %; v/v) oder Dimethylsulfoxid (DMSO; 3-15 %; v/v), wobei DMSO höhere Überlebensraten ermöglicht (Day 2007, Wood et al. 2008). Allerdings wirkt DMSO cytotoxisch, insbesondere unter Lichteinwirkung. Eine schnelle Durchführung und das unverzügliche Entfernen des Kryoprotektanten sind notwendige Bedingungen für eine erfolgreiche Gefrierkonservierung. Die Gefriertechniken können das Eintauchen in flüssigen Stickstoff oder 2-Schritt-Gefriermethoden umfassen (Day 2004). Die Lagerung bei -80°C ergab für kürzere Gefrierperioden annehmbare Reaktivierungsraten (Romo & Bécares 1992). Der Einfluss der Kryopreservation auf die Toxinproduktion von Cyanobakterien wurde bisher wenig untersucht, jedoch konnten Wood et al. (2008) zeigen, dass die untersuchten Cyanobakterien ihre Fähigkeit zur Synthese von MCs, NOD, ANA bzw. STX nach einem Gefrier-Tau-Zyklus bewahrten.

3 Zielstellungen der Arbeit

I Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter auf das Wachstum und die Toxinproduktion ausgewählter Cyanobakterien

Die Untersuchung des Einflusses biotischer und abiotischer Faktoren auf das Wachstum und die Toxinproduktion von Cyanobakterien kann weiterführende Erkenntnisse zur ökologischen Bedeutung von cyanobakteriellen Toxinen sowie den Populationsdynamiken bei der massenhaften Vermehrung von Cyanobakterien liefern. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Bedeutung der Makronährstoffe Nitrat und Phosphat sowie des pH-Wertes im Medium untersucht werden. Außerdem war exemplarisch der allelopathische Einfluss des Cyanobakteriums *Synechocystis sp.* SAG 92.79 als biotischer Wachstumsfaktor zu messen. Im Rahmen der Kultivierungsversuche sollte ferner eine Methode der Gefrierkonservierung von Cyanobakterien entwickelt, und hinsichtlich ihrer Eignung zur Reaktivierung der Vitalität und der damit verbundenen Toxinproduktion getestet werden. Schließlich sollte untersucht werden, ob Faktoren der Wachstumsförderung von Cyanobakterien zugleich als fördernde Faktoren der Toxinproduktion wirksam sind, oder aber moderate Stressoren die Toxinbiosynthese stimulieren.

II Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS-basierten Methode zur Bestimmung von BMAA und DAB in Cyanobakterien

Im Hinblick auf die wissenschaftliche Kontroverse über das Vorkommen der neurotoxischen Isomere BMAA und DAB in Cyanobakterien sollte ein experimentell begründeter Standpunkt vertreten werden. Dazu waren neue Methoden der Probenaufbereitung, gefolgt von chromatografischer Trennung und massenselektiver Detektion zu entwickeln, diese mit den bestehenden Methoden zu vergleichen und zur Analyse von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis sowie zur Untersuchung diverser freilebender Cyanobakterien unterschiedlicher Provenienz hinsichtlich des Vorkommens von BMAA und DAB einzusetzen. Die Ergebnisse sollten auf der Basis einer methodologischen Kritik der etablierten Methoden diskutiert werden.

III Vorkommen und Nachweis desmethylierter cyanobakterieller Peptidtoxine

Die Bedeutung von Desmethyl-Varianten der Microcystine und des Nodularins sollte im Rahmen der Analyse von Phytoplanktonproben globaler Herkunft ermittelt werden. Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft der MC-Bestimmungsmethode gemäß der

Norm ISO 20179 sollte ein chromatografisches Trennverfahren entwickelt werden, das neben den rechtlich relevanten Microcystinen MC-LR, -RR und -YR sowie dem Nodularin eine eindeutige Erfassung der jeweiligen Desmethyl-Varianten unter Beibehaltung der UV-Detektion ermöglicht. Außerdem sollten unterschiedliche Massensensoren (Triple-Quadrupol, Ionenfalle) hinsichtlich ihres Potenzials zur Strukturaufklärung desmethylierter Peptidtoxine getestet werden. Darauf aufbauend war eine Methode zum stereospezifischen Nachweis der Aminosäuren des Peptidrings im Hinblick auf eine Aufklärung der exakten chemischen Struktur zyklischer Peptidtoxine zu entwickeln.

IV Optimierung einer Multikomponentenmethode zur flüssigchromatografischen Trennung und massenspektrometrischen Detektion cyanobakterieller Toxine

Basierend auf der Methode von Hiller et al. (2007) sollte unter Berücksichtigung aller Gruppen cyanobakterieller Toxine eine Screening-Methode zur flüssigchromatografischen Trennung und massenspezifischen Detektion der Toxine optimiert werden. Dabei sollte insbesondere die Retention der polaren Analyten ANA, CYN und PSP erhöht sowie eine chromatografische Trennung und die selektive (tandem)massenspektrometrische Detektion von Anatoxin-a und Phenylalanin erreicht werden, um die Methode auf der Basis der Kopplung LC-MS(/MS) auch im Rahmen der Routine-Analytik einsetzen zu können und damit die Effizienz der Kontrollen auf diese Toxine weiterhin zu steigern.

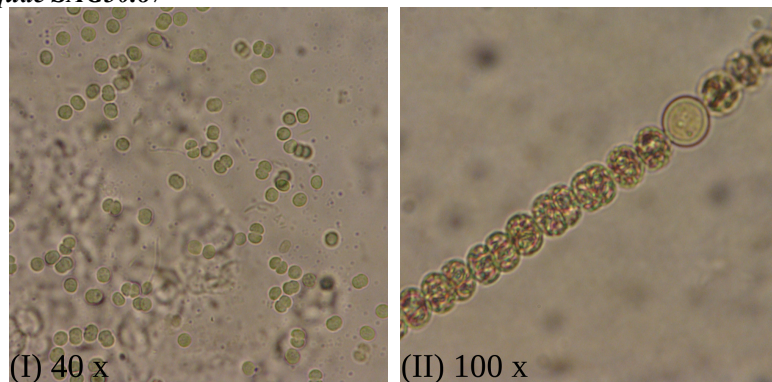
4 Material und Methoden

4.1 Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter auf das Wachstum und die Toxinproduktion ausgewählter Cyanobakterien

4.1.1 Auswahl der Organismen

Wesentliche Kriterien für die Auswahl der Organismen waren das Vermögen zur Biosynthese der verschiedenen cyanobakteriellen Toxine (MCs, ANA) in möglichst hohen Konzentrationen und hohe Wachstumsraten sowie eine einfache Isolierung während der Zellernte mittels Zentrifugation, insbesondere eine geringe Auftriebswirkung durch Gasvesikel der cyanobakteriellen Zellen. Als Produzent von Anatoxin-a wurde *Anabaena flos-aquae* SAG30.87 aus der Sammlung von Algenkulturen Göttingen (SAG) ausgewählt. Der *Strain* wurde 1961 von P.R. Gorham unter der Bezeichnung NRC 44-1 aus dem Phytoplankton des Lake Burton, der Provinz Saskatchewan in Canada isoliert. Außerdem wurde der Microcystin-Produzent *Microcystis aeruginosa* AB2005/31 für die Kultivierungsversuche herangezogen, welcher im Jahr 2005 aus dem Lake Chao¹¹ (Anhui Provinz, China) isoliert wurde. Zur Kontrolle von Fremdkontaminationen wurden die Kulturen (Abb. 10) stichprobenartig mikroskopiert (ICS KF2, Zeiss, Jena, Dt.).

Abb. 10 Mikroskopie der cyanobakteriellen Strains (I) *Microcystis aeruginosa* AB2005/31 und (II) *Anabaena flos-aquae* SAG30.87



4.1.2 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in autoklavierten (Prestige Medical Autoclave, Blackburn, UK) Erlenmeyer-Kolben (250 ml), die mit Baumwollstopfen geschlossen und mit Parafilm[®] versiegelt wurden. Die Kultivierungstemperatur betrug 24°C und die Lichtintensität $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Zur Etablierung eines Universalmediums für Cyanobakterien wurden die Kulturmedien BG-11 (Rippka & Herdman 1992/1993), ASM-1 (Gallon et al. 1987), MLA (Bolch & Blackburn 1996) und Z8 (Hughes et al. 1958) verwendet (Tab. 9). Im Zuge der

¹¹ Der See wird zur Wasserversorgung zahlreicher Städte der Anhui Provinz genutzt.

Einrichtung einer Kultursammlung wurden die unterschiedlichen coccoidalen und filamentösen Cyanobakterien mit den jeweiligen Medien getestet. Dabei zeigte sich einzig MLA, bzw. eine Modifikation des Mediums mit höherem Stickstoffgehalt (MLA_N für nicht N-fixierende *Strains*, 0,75 g l⁻¹ NaNO₃), für alle in Kultur befindlichen cyanobakteriellen *Strains* geeignet und wurde ausschließlich für die weitere Kultivierung genutzt.

Tab. 9 Nährstoffzusammensetzung der verwendeten Kulturmedien

Nährstoffe	BG-11	ASM-1	MLA	Z8
NaNO ₃ (mg l ⁻¹)	1500	170	170	467
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O (mg l ⁻¹)	-	-	-	59
NH ₄ Cl (mg l ⁻¹)	-	-	-	31
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O (mg l ⁻¹)	55	22,8	43,8	31
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (mg l ⁻¹)	-	17,8	-	-
MgSO ₄ 7H ₂ O (mg l ⁻¹)	75	36,4	49,4	250
MgCl ₂ 6H ₂ O (mg l ⁻¹)	-	29,1	-	-
NaCl (mg l ⁻¹)	-	117	-	-
CaCl ₂ 2H ₂ O (mg l ⁻¹)	36	27,8	29,4	-
H ₃ BO ₃ (mg l ⁻¹)	2,86	2,474	2,47	3,1
NaHCO ₃ (mg l ⁻¹)	-	66,6	169,6	-
Na ₂ CO ₃ (mg l ⁻¹)	20	-	-	20
Fe(III)NH ₄ citrat (mg l ⁻¹)	6	-	-	-
FeCl ₃ 6H ₂ O (mg l ⁻¹)	-	0,908	1,58	-
FeEDTA (mg l ⁻¹)	-	-	-	6,4
Na ₂ EDTA (mg l ⁻¹)	1	7,374	4,36	-
Citronensäure (mg l ⁻¹)	6	-	-	-
MnCl ₂ 4H ₂ O (mg l ⁻¹)	1,81	1,2	0,36	-
MnSO ₄ H ₂ O (mg l ⁻¹)	-	-	-	1,69
ZnCl ₂ (mg l ⁻¹)	-	0,436	-	-
ZnSO ₄ 7H ₂ O (mg l ⁻¹)	0,22	-	0,022	0,22
NaMoO ₄ H ₂ O (mg l ⁻¹)	0,39	0,020	0,006	-
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O (mg l ⁻¹)	-	-	-	0,088
CuSO ₄ 5H ₂ O (µg l ⁻¹)	80	0,2	10	30
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O (mg l ⁻¹)	0,05	-	-	0,05
CoCl ₂ 6H ₂ O (mg l ⁻¹)	-	0,019	0,01	-
Na ₃ VO ₄ (mg l ⁻¹)	-	-	-	0,02
NiSO ₄ 6H ₂ O (mg l ⁻¹)	-	-	-	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (mg l ⁻¹)	-	-	-	0,1
CdCl ₂ (mg l ⁻¹)	-	-	-	0,03
CrSO ₄ (mg l ⁻¹)	-	-	-	0,03
KJ (mg l ⁻¹)	-	-	-	0,083
Thiamin HCl (mg l ⁻¹)	-	-	0,1	-
Biotin (µg l ⁻¹)	-	-	0,05	-
Cyanocobalamin (µg l ⁻¹)	-	-	0,05	-

4.1.2.1 Variation des Nitratgehaltes im Medium

Zur Herstellung von MLA_N-Medium mit Nitrat-N-Konzentrationen von 0,0 mg l⁻¹ (N0), 41,2 mg l⁻¹ (N1), 82,4 mg l⁻¹ (N2), 123,6 mg l⁻¹ (N3), 164,8 mg l⁻¹ (N4) und 247,2 mg l⁻¹ (N5) wurde ein MLA-Konzentrat (40x) ohne NaNO₃ vorbereitet (MLA 40x-N). Dabei entspricht N3 der Zusammensetzung des unmodifizierten MLA_N-Mediums. Die modifizierten N-Konzentrationen wurden durch Zugabe von NaNO₃ in Konzentrationen von 0,0 g l⁻¹ (N0), 0,25 g l⁻¹ (N1), 0,5 g l⁻¹ (N2), 0,75 g l⁻¹ (N3), 1,0 g l⁻¹ (N4) und 1,5 g l⁻¹ (N5) erreicht.

4.1.2.2 Variation des Phosphatgehaltes im Medium

Zur Herstellung von MLA_N-Medien mit Phosphat-P-Konzentrationen von 0,6 mg l⁻¹ (P1), 3,0 mg l⁻¹ (P2), 6,0 mg l⁻¹ (P3) und 9,0 mg l⁻¹ (P4) wurde ein MLA-Konzentrat (40x) ohne

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ vorbereitet (MLA 40x-P). Dabei entspricht P3 der Zusammensetzung des unmodifizierten MLA_N -Mediums. Für eine konstante Kaliumkonzentration der Medien wurden die Stammlösungen S1 ($4,422 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), S2 ($3,954 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$) und S3 ($2,6 \text{ g l}^{-1} \text{ KCl}$) angefertigt und in entsprechenden Relationen (S1 / S2 / S3) den modifizierten Kulturmedien P1 (1,0 ml / - / 10,0 ml), P2 (5,0 ml / - / 5,5 ml), P3 (10,0 ml / - / -) und P4 (- / 10,0 ml / 2,8 ml) zugesetzt.

4.1.2.3 Variation des pH-Wertes im Medium

MLA_N -Medien (pH 9) wurden unter aseptischen Bedingungen (Laminarbox, Heraeus, Hanau, Dt.) mit 1% HCl und 1N NaOH auf pH 7,5 bzw. 10,5 eingestellt.

4.1.2.4 Nutzung von gebrauchtem Medium (GM)

Gebrauchtes Medium des nicht-toxischen cyanobakteriellen Strains *Synechocystis sp.* SAG 92.79 wurde nach Kultivierung über einen Zeitraum von 3 Wochen durch die Trennung von Zellen und Medium mittels Zentrifugation sowie anschließender Vor- (Glasfaserfilter GF6 Whatman, Roth, Karlsruhe, Dt.) und Sterilfiltration ($0,22 \mu\text{m}$, Stericup Express™ Plus, Millipore, Milford, CT, USA) erhalten. Frisches MLA_N -Medium wurde im Verhältnis 50:50 (v/v) mit dem gebrauchten Medium gemischt.

4.1.2.5 Kryopreservation von Cyanobakterien

Die applizierte Methode der Gefrierkonservierung von Cyanobakterienkulturen wurde durch Modifikation und Optimierung der Methoden von Brand (<http://bilbo.bio.purdue.edu/www-cyanosite/protocols/cryo.html>), Tanaka et al. (1999) und Kuzmina (2004) entwickelt. Zunächst wird das Flüssigmedium mit exponentiell wachsenden Cyanobakterien in ein 50 ml Falcontube überführt, welches bei ca. 2000 g, in Abhängigkeit von der Auftriebswirkung der intrazellulären Gasvakuolen in der Wassersäule, für 1 min zentrifugiert wird. Nach dem Verwerfen des Überstands werden 15 ml filtersterilisiertes Gefriermedium vorsichtig auf das Pellet gegeben, behutsam resuspendiert, auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Gefriermedium entfaltet seine kryoprotektive Wirkung mittels 8 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem spezifischen halbkonzentrierten Kulturmedium (z.B. MLA-Medium), indem es die Zellen vor der Ausbildung von Eiskristallen schützt. Indes entfaltet DMSO bei Raumtemperatur eine zytotoxische Wirkung, die unter Einfluss von Licht verstärkt wird. Sobald die cyanobakteriellen Zellen

mit dem Gefriermedium in Kontakt kommen, muss der Ansatz schnellstmöglich schockgefroren und vor Licht geschützt werden (Raum abdunkeln, Gefäße mit Alufolie ummanteln). Kleine Ansätze sind für ein schnelles Einfrieren und Auftauen der Proben, mithin für die Verhinderung der Eiskristallbildung, unerlässlich.

Bei Bedarf können die Zellen aufgetaut und reaktiviert werden. Das Auftauen erfolgt bei 37°C für etwa 5 min. Anschließend muss das Gefriermedium schnellstmöglich entfernt werden, indem für 1 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand sorgfältig unter sterilen Bedingungen abpipettiert wird. In einem Waschschrift wird das Zellpellet in 1 ml des Kulturmediums resuspendiert, wie zuvor zentrifugiert und der Überstand entfernt. Letztlich wird das Zellpellet mit etwas Kulturmedium resuspendiert und in einen 50 ml Erlenmeyerkolben (mit Alufolie umhüllt) überführt, in dem 20-30 ml Kulturmedium vorgelegt wurden. Zunächst sind die Zellen noch sehr sensibel gegenüber Licht und mechanischen Reizen (Vermeidung des Schüttelns). Nach 2 Tagen bei Dunkelheit wird die Alufolie entfernt. Die Kultivierung kann nun wie üblich erfolgen.

4.1.3 Ermittlung der Wachstumsparameter

Die Variation unterschiedlicher Kultivierungsparameter kann sowohl einen Einfluss auf die Biomasseproduktion (Zellteilungsrate) als auch auf die Toxinproduktion (Toxinvarianten, Toxinkonzentrationen) ausüben. Dabei können die optimalen Bedingungen des Wachstums von jenen der Toxinproduktion abweichen. Zur Untersuchung des Wachstums der Cyanobakterien wurden das Trockengewicht der Zellen und der Gehalt an Chlorophyll-*a* bestimmt.

4.1.3.1 Bestimmung des Trockengewichts

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden 25 ml einer homogenen Probe filtriert. Die Glasfaserfilter (GF6, Whatman, Roth, Karlsruhe, Dt.) wurden bei 105°C für 24 h getrocknet und rückgewogen. Ein möglicher Gewichtsverlust der Filter nach Trocknung wurde durch die Filtration von Reinstwasser berücksichtigt (Blindprobe). Das Trockengewicht des Retentats wurde auf das Volumen der filtrierten Probe bezogen.

4.1.3.2 Bestimmung des Gehaltes an Chlorophyll-*a*

Zur Bestimmung des Chlorophyll-*a*-Gehaltes wurde eine modifizierte Methode von Jespersen und Christoffersen (1987) angewendet. Ein definiertes Volumen einer homogenen Kultur (5 ml) wurde bei 5000 g für 4 min zentrifugiert. Nach der Abnahme des

Überstandes wurden 5 ml Ethanol (96 %) als Extraktionsmittel zugegeben, die Probe homogenisiert (Vortex-Mixer), für 16 h bei Dunkelheit gelagert und anschließend bei 5000 g für 4 min zentrifugiert. Der Chlorophyll-*a*-Gehalt wurde mit einem Spektralphotometer ermittelt, indem die Trübung des Überstandes (750 nm) von seiner Absorption bei 665 nm subtrahiert wurde. Der erhaltene Wert wird mit dem Extraktionsvolumen multipliziert und durch den spezifischen Absorptionskoeffizienten von Chlorophyll-*a* in 96 % Ethanol ($83,4 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sowie durch das entsprechende Volumen der Kultur dividiert.

4.1.4 Bestimmung der Toxinproduktion

Zur Bestimmung der Toxingehalte wurden die Proben zu Beginn der Versuchsreihen sowie alle 2 Wochen bis zum Ende der jeweiligen Versuchsreihe analysiert.

4.1.4.1 Zellernte und Extraktion cyanobakterieller Toxine

Die Trennung der Zellen vom Medium erfolgte durch Dekantierung und Zentrifugation (4 min, 5000 g) in 50 ml Falcontubes. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet bei -20°C gefroren und anschließend für 24 h gefriergetrocknet (Christ Alpha 1-4 Lyophilisator, Osterode, Dt.). ANA und MCs wurden mit einer Mischung aus 0,1 M Essigsäure und Methanol (50:50; v/v) extrahiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Homogenisation (Vortex-Mixer) und Ultraschallbehandlung (1 min Ultraschallstab, *GM70*; 15 min Ultraschallbad, *Sonorex*; Bandelin, Berlin, Dt.). Nach der Zentrifugation des Rohextraktes bei 16000 g für 10 min wurde der Überstand in ein HPLC-*Vial* filtriert (0,22 µm Nylon-Spritzenfilter, Roth, Karlsruhe, Dt.) und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

4.1.4.2 LC-MS-Bestimmung von Microcystinen

Die flüssigkeitschromatografische Trennung von MCs erfolgte an einem HPLC-System (*Series 200*, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) unter Einsatz der HPLC-Säule Luna C18(2) (250 x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) und einer Gradientenelution (0 min 20 % B, 15-17 min 100 % B, 18-30 min 20 % B) bei der konstanten Flussrate von 1 ml min^{-1} (Split 7:3; Abfall/MS). Die Eluenten enthielten jeweils 5 mM Ammoniumformiat und 53 mM Ameisensäure in Wasser (Eluent A) und Acetonitril/Wasser (90:10; v/v; Eluent B). Die massenspektrometrische Detektion der Microcystinvarianten erfolgte an einem API 165 Massenspektrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit Atmosphärendruck-Ionisierung im Turbo-Ionenspray-Modus (TIS)

unter Verwendung von Stickstoff bei 400°C und 9 l min⁻¹. Das Vernebelungsgas (NEB, N₂) hatte eine Flussrate von 10 l min⁻¹, während die Ionisierungsspannung auf 3500 V, das *Declustering Potential* (DP) auf 20 V, das *Focussing Potential* (FP) auf 125 V und das *Entrance Potential* (EP) auf 6 V eingestellt war. Unter positiver Ionisierung wurden die doppelt geladenen Ionen [M+2H]²⁺ *m/z* (amu) = 512,7 (dm-MC-RR) und 519,7 (MC-RR) sowie die einfach geladenen Ionen [M+H]⁺ *m/z* (amu) = 896,5 (dm-MC-LA), 910,5 (MC-LA), 986,5 (MC-LF), 967,5 (dmdm-MC-LR), 981,5 (dm-MC-LR), 995,5 (MC-LR), 1025,5 (MC-LW), 1031,5 (dm-MC-YR) und 1045,5 (MC-YR) erfasst.

4.1.4.3 LC-MS-Bestimmung von Anatoxin-a

Anatoxin-a wurde wie unter 4.1.4.2 bestimmt, jedoch wurden abweichend die polareren Substanzen Anatoxin-a und Phenylalanin auf der HPLC-Säule Synergi Polar RP (250 x 4,6 mm, 4 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) unter Anwendung der Gradientenelution (0-6 min 5 % B, 16-19,5 min 100 % B, 20-30 min 5 % B) flüssigchromatografisch getrennt, wobei das einfach positiv geladene Ion *m/z* = 166,1 amu bei DP = 47 V, FP = 155 V und EP = 7,5 V mittels MS detektiert wurde.

4.1.4.5 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Toxinkonzentrationen der Proben erfolgte durch die Kalibrierung der Peakflächen der jeweiligen Toxinstandards (MC-LR, -RR, -YR, -LA, -LF, -LW, ANA). Weil Standards der desmethylierten MCs kommerziell nicht erhältlich waren, wurden deren Konzentrationen auf der Basis der koeluierenden methylierten MC-Standards quantifiziert, und folglich müssen diese kritisch interpretiert werden.

4.1.5 Experimenteller Aufbau

Zum Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums wurden Aliquote der Stammkulturen von *Microcystis aeruginosa* AB2005/31, *Anabaena flos-aquae* SAG 30.87 unmittelbar vor Beginn eines Experiments zur Bestimmung des Trockengewichts, des Chlorophyll-*a*-Gehaltes und der Toxinkonzentrationen geerntet. Die verschiedenen Experimente (N_{Exp}, P_{Exp}, pH_{Exp}, GM_{Exp}, Tab. 10) wurden gestartet, indem ein definiertes Volumen der übrigen Stammkultur mit dem 7,5-fachen Volumen des jeweiligen modifizierten Mediums vermischt wurde. Daraus wurden je 150 ml, entsprechend einem Inokulum von je 20 ml, auf 3 Erlenmeyerkolben (Triplikat) verteilt. Zur Kontrolle des Wachstums wurden wöchentlich Proben genommen und der Volumenverlust durch Zugabe von 30 ml frischem

Medium ausgeglichen. Im Abstand von 2 Wochen wurden zusätzlich je 100 ml zur Toxinanalyse geerntet. Das Residualvolumen der Kultur (20 ml) diente als Inokulum und wurde mit frischem Medium auf 150 ml aufgefüllt. Neben dem Einfluss des Mediums wurde ferner die Wirkung der Kryopreservation (Kryop.) auf das Wachstum und die Toxinproduktion von Cyanobakterien untersucht.

Tab. 10 Überblick des experimentellen Aufbaus und der modifizierten Kultivierungsbedingungen

Experiment	Nitrat-N (mg l ⁻¹)	Phosphat-P (mg l ⁻¹)	pH	GM (%)	Dauer (Wochen)
N _{Exp}	0 / 41,2 / 82,4 / 123,6 / 164,8 / 247,2	6,0	9,2	0	6
P _{Exp}	123,6	0,6 / 3,0 / 6,0 / 9,0	9,2	0	6
pH _{Exp}	123,6	6,0	7,5 / 9,2 / 10,5	0	6
GM _{Exp}	123,6	6,0	9,2	50	6
Kryop.-Exp	123,6	6,0	9,2	0	4

4.1.6 Statistische Signifikanz

Zur Bestimmung einer statistischen Signifikanz der Unterscheidung der Messwerte zweier Vergleichsgruppen innerhalb eines Experiments wurden unter Zugrundelegung der t-Student-Verteilung signifikante Abweichungen mit Hilfe des Vergleichs der Konfidenzintervalle bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ (95 % Sicherheitswahrscheinlichkeit) ermittelt.

4.2 Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS-basierten Methode zur Bestimmung von BMAA und DAB in Cyanobakterien

4.2.1 Standardsubstanzen

Standards der neurotoxischen Isomere *L*-BMAA · HCl (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) und *DL*-2,4-DAB · 2HCl (Acros Organics, Geel, Belgien) wurden in reinem Wasser gelöst. Die Ausgangslösungen (100 ng µl⁻¹) dienten der Erstellung einer Verdünnungsreihe für die 6-Punkt-Kalibrierung.

4.2.2 Probenmaterial

Samen von *Cycas revoluta* (Fesaja-Versand, Schönhagen, Dt.) dienten als Positivkontrolle, während *Chlorella sp.* (Grünalge) als Negativkontrolle fungierte. Mit Ausnahme der Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis von *Spirulina sp.* und *Aphanizomenon flos-aquae* wurden die cyanobakteriellen Proben sämtlich, wie unter 4.1.2 beschrieben, kultiviert. Detaillierte Informationen zu den untersuchten Proben sind in den Tabellen 13-14 (5.2.4) enthalten. Die cyanobakteriellen Zellen wurden mittels Zentrifugation (4 min, 5000 g) geerntet, gefriergetrocknet (Christ Alpha 1-4 Lyophilisator, Osterode, Dt.) und bis zur Probenaufbereitung bei -20°C gelagert.

4.2.3 Probenaufbereitung

Je cyanobakterieller Probe wurden 50 mg eingewogen und die freien Aminosäuren mit 1 ml einer 0,1 M Trichloressigsäure-Lösung unter Ultraschallbehandlung (1 min Ultraschallstab, *GM70*; 15 min Ultraschallbad, *Sonorex*; Bandelin, Berlin, Dt.) extrahiert sowie mittels Zentrifugation (16000 g, 10 min) vom Proteinpräzipitat (Zelllysat) getrennt. Der sedimentierte Rückstand wurde zum Nachweis der Protein-assoziierten nichtproteinogenen Aminosäuren mit 6 M HCl (1 ml) bei 110°C für 17 h hydrolysiert. Da in verschiedenen Studien (Cox et al. 2005, Esterhuizen & Downing 2008) kein festes Verhältnis (definierter Quotient) zwischen freiem und proteingebundenem BMAA ermittelt wurde, wurde der Extrakt des Überstandes mit dem Hydrolysat vereint und unter N₂ bei 50°C bis zur Trocknung eingedampft. Zur restlosen Entfernung der Salzsäure wurde 1 ml Methanol zugegeben (Entstehung von CH₃Cl_(g) und H₂O) und erneut vollständig getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml H₂O gelöst, filtriert und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

4.2.4 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz für BMAA und DAB sowie der Stabilität dieser neurotoxischen Aminosäuren während der sauren Hydrolyse wurde die Wiederfindungsrate nach der Probenaufbereitung bestimmt. Dazu wurden sowohl vor der Extraktion der freien Aminosäuren sowie separat vor der Hydrolyse je 2 Ansätze (I) ohne Zusatz von BMAA oder DAB sowie mit Zusatz von (II) 1 µg, (III) 2,5 µg und (IV) 5 µg des jeweiligen Toxinstandards wie unter 4.2.3 beschrieben aufbereitet. Die Gehalte in den Proben wurden anschließend quantitativ ausgewertet und die Wiederfindungsraten über die durchschnittlich ermittelten Konzentrationen der Doppelbestimmungen prozentual zur eingesetzten Menge bestimmt.

4.2.5 LC-MS/MS-Bestimmung von BMAA und DAB

Die flüssigchromatografische Trennung mit einem HPLC-System (Pumpe LC-10AT, Autoinjektor SIL-10AD VP und Controller SCL-10A VP, Shimadzu, Kyoto, Japan) und unter Verwendung der Säule Luna HILIC (250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) in Kombination mit der mobilen Phase, bestehend aus 2 mM Ammoniumformiat (pH 3) in (A) H₂O und (B) ACN / H₂O (90:10; v/v), ergab ein Optimum aus Nachweisempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit mit den Eluenten 5A/B aus einer ganzen Reihe getesteter Eluenten, wobei eine Gradientenelution (0-2,5 min 100 % B, 10-12,5 min 50 % B, 13-30 min 100 % B) durchgeführt wurde (Tab. 11).

Tab. 11 Optimierung der mobilen Phase zur chromatografischen Trennung von BMAA und DAB

Eluent	Zusammensetzung
1A	40 mM Essigsäure in Wasser
1B	10 mM Essigsäure in Wasser / Acetonitril 10:90 (v/v)
2A	40 mM Essigsäure in Wasser
2B	10 mM Essigsäure in Wasser / Methanol 10:90 (v/v)
3A	20 mM Essigsäure in Wasser
3B	20 mM Essigsäure in Wasser / Acetonitril 10:90 (v/v)
4A	20 mM Ameisensäure in Wasser
4B	5 mM Ameisensäure in Wasser / Acetonitril 10:90 (v/v)
5A	2 mM Ammoniumformiat in Wasser (pH 3, Ameisensäure)
5B	2 mM Ammoniumformiat (pH 3; Ameisensäure) in Wasser / Acetonitril 10:90 (v/v)
6A	5 mM Ammoniumformiat in Wasser (pH 3, Ameisensäure)
6B	5 mM Ammoniumformiat in (pH 3; Ameisensäure) in Wasser / Acetonitril 10:90 (v/v)
7A	2 mM Ammoniumacetat in Wasser (pH 3,8, Essigsäure)
7B	2 mM Ammoniumacetat (pH 3,8; Essigsäure) in Wasser / Acetonitril 10:90 (v/v)
8A	5 mM Ammoniumacetat in Wasser (pH 3,8, Essigsäure)
8B	5 mM Ammoniumacetat (pH 3,8; Essigsäure) in Wasser / Acetonitril 10:90 (v/v)

Daraufhin erfolgte die Optimierung des Gradienten der Eluenten 5A/B. Bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} wurden 2 unterschiedliche Gradienten für höchste Nachweisempfindlichkeit (Gradient 1: 0-2,5 min 90 % B, 8-10 min 30 % B, 11-30 min 90 % B) und Trennungseffizienz (Gradient 2: 0 min 80 % B, 2-10 min 50 % B, 11-30 min 80 % B) etabliert. Die mobile Phase der LC wurde über einen *Split* (7/3) in die MS/MS transferiert. Außerdem wurde der Einfluss der chromatografischen Trennung auf die Nachweisempfindlichkeit unter Anwendung weiterer HILIC-Methoden untersucht. Einerseits wurde die HILIC-Säule TSK-gel Amide-80 ($5 \mu\text{m}$, $150 \times 2,0 \text{ mm}$, Kyoto, Japan) in Verbindung mit einer mobilen Phase aus (A) Wasser und (B) Acetonitril bei einem linearen Gradienten (0 min 90% B, 20-30 min 60% B, 31-40 min 90% B, Flussrate von $0,2 \text{ ml min}^{-1}$) gemäß der Methode von Kubo et al. (2008) eingesetzt. Andererseits wurde eine ZIC®-HILIC-Säule (5 mm, $150 \times 2,1 \text{ mm}$, SeQuant, Umeå, Schweden) in Verbindung mit einer mobilen Phase aus Acetonitril und 60 mM Ameisensäure in Wasser (65:35, v/v) unter isokratischer Elution mit einer Flussrate von $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ gemäß der Methode von Rosén und Hellenäs (2008) angewendet.

Die tandemmassenspektrometrische Detektion erfolgte an einem API 365 *Triple-Quadrupol*-System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter API im TIS-Modus. Die technischen Bedingungen wurden für *L*-BMAA über das grafische *Interface* der *Analyst 1.4.2 Software* für höchste Nachweisempfindlichkeit im *Tune*-Modus optimiert. Demzufolge wurde Stickstoff bei 500°C und 8 l min^{-1} zur Trocknung des Ionensprays genutzt. Das Vernebelungsgas (NEB, N_2) hatte eine Flussrate von 13 l min^{-1} , während die Ionisierungsspannung auf 3400 V, das *Declustering Potential* (DP) auf 20 V, das *Focussing Potential* (FP) auf 150 V und das *Entrance Potential* (EP) auf 4 V eingestellt war. Das Kollisionsgas (N_2) hatte eine Flussrate von 7 l min^{-1} . Außerdem war die Kollisionsenergie auf 12 V und das Kollisionszellenausgangspotential auf 10 V eingestellt.

Das MS/MS-System wurde sowohl im Produkt-Ionen-Scan-Modus (PIS, Bestimmung spezifischer Massenspektren von BMAA und DAB bei m/z 119,1 amu), als auch im MRM-Modus unter positiver Ionisierung angewendet.

4.2.6 Quantifizierung

Die quantitative Bestimmung von BMAA und DAB erfolgte über die Kalibrierung der Peakflächen der Toxinstandards. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Standardsubstanzen als Hydrochlorid bzw. Dihydrochlorid vorlagen. BMAA wurde bei einem Massenübergang von m/z 119,1 > 102,1 amu gemessen, DAB bei m/z 119,1 > 101,3 amu.

4.3 Vorkommen und Nachweis desmethylierter cyanobakterieller Peptidtoxine

4.3.1 Standardsubstanzen

Standardlösungen von NOD sowie MC-RR, -LR, -YR, -LA, -LF und -LW (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) wurden mit 50:50 MeOH/H₂O (v/v) verdünnt. Die Ketosäuren Brenztraubensäure und 2-Ketobuttersäure sowie die Aminosäuren *D*-Ala, *L*-Leu, *D*-MeAsp, *D*-Glu und *L*-Arg wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

4.3.2 Probenmaterial

Phytoplanktonproben wurden während der „Blüten“ von *M. aeruginosa* im Senftenberger See (09/2005, 07/2006; Brandenburg) und im Bautzener Stausee (09/2008; Sachsen) aus dem Oberflächenwasser geerntet. Die *Strains* AB2005/17, 19, 22, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 40, 41, 42, 43, 45, 46 und 47 von *M. aeruginosa* wurden 2005 aus dem Lake Chaohu (Provinz Anhui, China) isoliert und wie unter 4.1.2 kultiviert. Proben von *N. spumigena* wurden in den Jahren 2004 und 2008 aus der Ostsee gewonnen. Alle Proben wurden vor der Extraktion der MCs und NODs gefriergetrocknet (Christ Alpha 1-4, Osterode, Dt.)

4.3.3 Extraktion cyanobakterieller Peptidtoxine

Zur Extraktion cyanobakterieller Peptidtoxine wurden 50 mg je lyophilisierter Probe eingewogen und mit 1 ml eines Gemisches aus MeOH/Wasser (50:50, v/v) versetzt. Nach der Homogenisation (Vortex-Mixer) erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallstab GM70 (1 min) und Ultraschallbad Sonorex (15 min; beide Bandelin, Berlin, Dt.). Anschließend wurde zentrifugiert (16.000 g, 10 min) und der Überstand mittels 0,22 µm Nylon-Spritzenfilter (Roth, Karlsruhe, Dt.) in ein HPLC-Vial filtriert.

4.3.4 Bestimmung cyanobakterieller Peptidtoxine mittels HPLC-UV

Zur Trennung und Detektion cyanobakterieller Peptidtoxine mittels HPLC-UV (M306 Pumpen und 234 Autosampler, Gilson-Abimed, Villiers le Bel, Frankreich; SPD-7A UV-Detektor, Shimadzu, Kyoto, Japan) wurde die Referenzmethode ISO 20179 (2005) unter Anwendung der HPLC-Säule Luna C18(2) (5 μ m, 250 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) eingesetzt. Außerdem wurde eine Methode zur chromatografischen Trennung von MC-LR, -YR und -RR von ihren einfach und zweifach desmethylierten Varianten entwickelt. Dazu wurde eine stationäre Pentafluorphenylphase (Monochrom MS, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, Varian, Darmstadt, Dt.) sowie eine mobile Phase bestehend aus 5 mM Ammoniumformiat und 53 mM Ameisensäure in H₂O/ACN (70/30; v/v) unter isokratischer Elution angewendet. Alternativ erfolgte die chromatografische Trennung mittels einer stationären Pentafluorphenylpropylphase (Luna PFP, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) in Verbindung mit der o.g. mobilen Phase im Verhältnis von 77/23 (H₂O/ACN; v/v). Die UV-Detektion erfolgte bei 238 nm. Die Fraktionen der zyklischen Peptidtoxine wurden mit einem Fraktionssammler (206, Gilson-Abimed, Villiers le Bel, Frankreich) gewonnen.

4.3.5 Bestimmung cyanobakterieller Peptidtoxine mittels LC-MS(/MS)

Die flüssigchromatografische Trennung und massenspektrometrische Detektion der MCs und NODs erfolgte wie im Kapitel 4.1.4.2 beschrieben. Unter positiver Ionisierung wurden die doppelt geladenen Ionen $[M+2H]^{2+}$ m/z 505,7 (dmdm-MC-RR), 512,7 (dm-MC-RR) und 519,7 (MC-RR) sowie die einfach geladenen Ionen $[M+H]^+$ m/z 811,5 (dm-NOD), 825,5 (NOD), 896,5 (dm-MC-LA), 910,5 (MC-LA), 986,5 (MC-LF), 967,5 (dmdm-MC-LR), 981,5 (dm-MC-LR), 995,5 (MC-LR), 1025,5 (MC-LW), 1017,5 (dmdm-MC-YR), 1031,5 (dm-MC-YR) und 1045,5 (MC-YR) mittels LC-MS erfasst. Insofern keine kommerziellen Standards der desmethylierten NODs und MCs erhältlich sind, wurden deren Konzentrationen auf Basis der Standardkalibrierungen der koeluierenden methylierten Varianten quantifiziert und müssen daher kritisch interpretiert werden. Die Strukturanalyse der zyklischen Peptide erfolgte u.a. mittels LC-MS/MS (SCL-10A VP System Controller, SIL-10AD VP Autoinjektor und LC-10AT Pumpen, Shimadzu, Kyoto, Japan; API 365, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) im MRM-Modus zum Nachweis der Adda- und DMAdda-Fragmentionen bei m/z 135,1 und 121,1 amu sowie im Produkt-Ionen-Scan-Modus (PIS) zur weiterführenden Analyse der chemischen Struktur und Fragmentierung der desmethylierten Peptidtoxine bei variablen Kollisionsenergien.

4.3.6 Bestimmung cyanobakterieller Peptidtoxine mittels LC-MS-IonTrap

Die flüssigchromatografische Trennung erfolgte mit einer stationären Pentafluorphenylpropylphase (Luna PFP(2), 5 μm 150 x 2,0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) an einer HPLC-Anlage (LC-20AP Pumpen, SIL-20AC Autosampler, CBM-20A Controller, DGU-20A5 Entgaser, Shimadzu, Kyoto, Japan). Die mobile Phase enthielt 5 mM Ammoniumformiat und 53 mM Ameisensäure in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (70:30, v/v) unter isokratischer Elution bei einer konstanten Flussrate von 0,3 ml min^{-1} . Die Massenspektrometrie erfolgte mit einer Ionenfalle (Bruker Daltonics esquire HCT, Billerica, MA, USA) bei m/z 505,7 (dmdm-MC-RR), 512,7 (dm-MC-RR), 519,7 (MC-RR), 967,5 (dmdm-MC-LR), 981,5 (dm-MC-LR), 995,5 (MC-LR), 1017,5 (dmdm-MC-YR), 1031,5 (dm-MC-YR) und 1045,5 (MC-YR). Für die Bestimmung der dm-NOD-Fraktion (*N. spumigena*, Ostsee, 2004) stand im November 2009 lediglich die HPLC-Säule Phenomenex Luna C18(2) (3 μm , 150 x 2,0 mm) zur Verfügung, die unter isokratischer Elution (30:70; 0,1% Ameisensäure in $\text{H}_2\text{O} / \text{ACN}$) bei einer Flussrate von 0,2 ml min^{-1} eine Antrennung der Desmethyl-Varianten ermöglichte. Alle Experimente unter Anwendung der Ionenfallen-Massenspektrometrie wurden an der *Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas* der Universität São Paulo (Brasilien) durchgeführt.

4.3.7 Mikrowellen-unterstützte Hydrolyse von MC-Fraktionen

Je 40-50 μg der separierten und getrockneten MC-Fraktionen von *M. aeruginosa* aus dem Senftenberger See (2005) wurden mit 1 ml 6 N HCl versetzt und unter Mikrowellenbestrahlung (1200 mega, high performance microwave digestion unit, Milestone, Shelton, CT, USA) bei 650 W und 160°C für 15 min hydrolysiert. Anschließend wurde die Salzsäurelösung unter Stickstoffgas eingedampft.

4.3.8 Derivatisierung der freien Amino- und Ketosäuren

Dehydroaminosäuren (Enamine) sind nicht säurestabil, wenn nur ein Wasserstoffatom der Aminogruppe substituiert ist. Daher werden die Dehydroaminosäuren der MCs und NODs nach saurer Hydrolyse in die entsprechenden Ketosäuren umgewandelt (Abb. 11). Stabile verdampfbare Derivate der Amino- und Ketosäuren wurden in parallelen Reaktionsschritten generiert, um eine eindeutige Bestimmung mittels GC-MS zu gewährleisten. Freie Aminosäuren wurden zunächst unter Zugabe von Methanol und Acetylchlorid methyliert. Danach reagierten die Aminosäuremethylester mit Trifluoressigsäureanhydrid zur Bildung der *N*-Trifluoracetyl-Aminosäure-*O*-Methylester

(*N*-TFA-Aminosäure-OMe) (Abb. 12). Die Derivatisierung der Ketosäuren erfolgte mit Pentafluorbenzylhydroxylamin (PFB-O-NH₂) zur Bildung der Pentafluorbenzyloxim-Ketosäuren. In einem zweiten Schritt reagiert das Intermediat mit *N*-Methyl-*N*-Trimethylsilyl-Trifluoroacetamid (MSTFA) zur Bildung von Pentafluorbenzyloxim-Ketosäure-Trimethylsilylethern (PFBoxim-Ketosäure-OTMS) (Abb. 12). Die derivatisierten Amino- und Ketosäuren wurden direkt in die Kopplung GC-MS injiziert.

Abb. 11 Dha, Mdha und Dhb als Vorläufer für die Ketosäuren Brenztraubensäure und 2-Ketobuttersäure

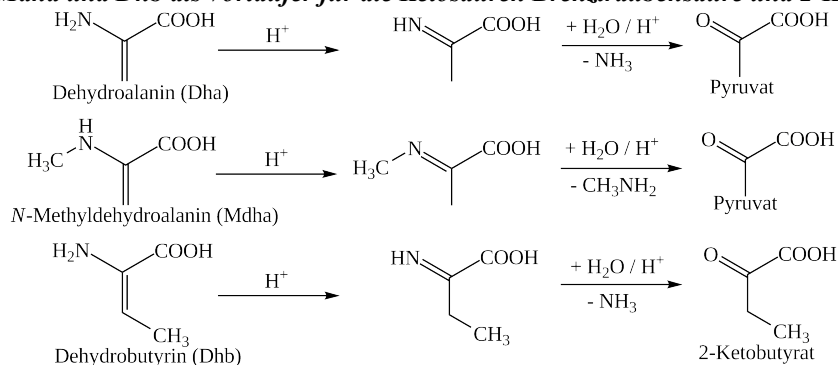
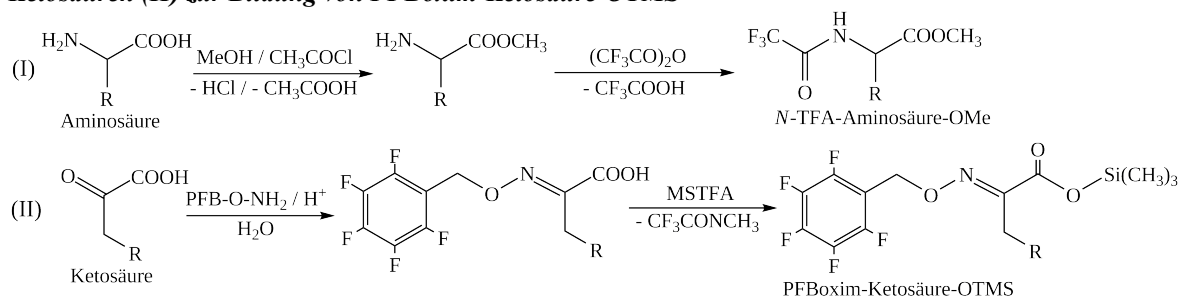


Abb. 12 Derivatisierung der Aminosäuren (I) zur Bildung von *N*-TFA-Aminosäure-OMe und der Ketosäuren (II) zur Bildung von PFBoxim-Ketosäure-OTMS



4.3.9 GC-MS-Bestimmung der derivatisierten Amino- und Ketosäuren

Die gaschromatografische Trennung sowie die massenspektrometrische Detektion wurde mit einem Gaschromatografen (HP 5890 II), einem Autosampler (HP 7673), einem massenselektiven Detektor (HP 5971) und einer geeigneten Software (HP ChemStation G1034C, Version 03.00; Hewlett-Packard, Waldbronn, Dt.) zur Integration der Chromatogramme durchgeführt. Als stationäre Phase wurde die stereospezifische Cyclodextrinphase der Kapillarsäule Lipodex E verwendet (25 m x 0,25 mm; Macherey-Nagel, Düren, Dt.). Wasserstoff wurde als Trägergas bei einem Druck von 0,3 bar genutzt. Das Temperaturprogramm begann bei 60 °C für 5 min und stieg bei einem linearen Temperaturanstieg von 5 °C min⁻¹ bis auf die Endtemperatur von 200 °C, die abschließend für 5 min gehalten wurde. Die Temperatur des Injektors und des Detektors wurde jeweils auf 250 °C eingestellt. Von jeder Probe wurden 5 µl ohne *Split* injiziert. Nach 4 min wurde

der *Split* (1:20) geöffnet. Die GC-Analyse der Aminosäurezusammensetzung ausgewählter MC-Fractionen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. habil. Bernd Christian durchgeführt.

4.4 Optimierung einer Multikomponentenmethode zur flüssigchromatografischen Trennung und massenspektrometrischen Detektion cyanobakterieller Toxine

4.4.1 Standardsubstanzen und Probenmaterial

Ein Rohextrakt aus *Nodularia spumigena* (Ostsee, 2004) und *Microcystis aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) wurde wie unter 4.3.3 gewonnen und mit Standardlösungen von STX, dcSTX, NEO, GTX1-4, dcGTX2-3, CYN (alle National Research Council, Halifax, Canada), ANA (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA), MC-RR, -LR, -YR, -LA, -LF, -LW und NOD (alle Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) vermischt. Außerdem wurden Standardlösungen von ANA und Phe (Roth, Karlsruhe, Dt.) miteinander vermischt.

4.4.2 Differenzierte Bestimmung von Anatoxin-a und Phenylalanin

Die getrennte Bestimmung von ANA und Phe stellt eine Voraussetzung für die routinemäßige Anwendung der Multikomponentenmethode dar. Zunächst sollte die chromatografische Trennung der beiden Komponenten erreicht werden, um im nächsten Schritt relevante chromatografische Systeme für die Optimierung der Multikomponentenmethode nach Hiller et al. (2007) zu testen. Die Ermittlung der MS/MS-Fragmentierungsmuster sollte die Spezifität der massenselektiven Detektion von ANA erhöhen.

4.4.2.1 Chromatografische Trennung von Anatoxin-a und Phenylalanin

Zur chromatografischen Trennung von ANA und Phe wurden unterschiedliche stationäre Phasen getestet. Zunächst sollte die HPLC-Säule Zorbax SB 300 C18 Silica (250 x 4,6 mm, 5 µm; Agilent, Santa Clara, CA, USA) gemäß der Methode von Gugger et al. (2005) unter Verwendung einer mobilen Phase aus (A) 0,1 % Ameisensäure in Wasser (pH 3,5) und (B) Acetonitril mittels eines linearen Gradienten (0 min 5 % B, in 30 min auf 20 % B) bei einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ getestet werden. Außerdem wurden unter Verwendung der gleichen Eluenten bei isokratischer Elution (5 % B) die HPLC-Säulen Supelcosil™ ABZ+ (200 x 4,6 mm, 5 µm; Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und Luna C18(2) (250 x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) geprüft, während die HPLC-Säule Phenomenex Luna HILIC mit einer mobilen Phase aus 5mM Ammoniumformiat und 53mM Ameisensäure in (A) ACN/H₂O (50:50; v/v) und (B) ACN/H₂O (90:10; v/v) unter Gradientenelution (0 min 100 % B, 10-12,5 min 0 % B, 13-

23 min 100 % B) untersucht wurde. Mit einer mobilen Phase aus 5mM Ammoniumformiat und 53mM Ameisensäure in (A) H₂O und (B) ACN/H₂O (90:10; v/v) wurden ferner die HPLC-Säulen Aqua, Synergi® Polar-RP und Synergi® Fusion-RP, Phenylhexyl und Luna PFP (alle Phenomenex) unter Gradientenelution (0-6 min 0 % B, 17-19 min 90 % B, 20-30 min 0 % B) getestet.

4.4.2.2 UV-Detektion von Anatoxin-a und Phenylalanin

Anatoxin-a weist ein Absorptionsmaximum von 227 nm auf, während Phenylalanin ultraviolettes Licht der Wellenlänge von 257 nm maximal absorbiert. Zur Detektion beider Analyten wurde mit Hilfe eines SPD-7A UV-Detektors (Shimadzu, Kyoto, Japan) bei $\lambda = 242$ nm gemessen.

4.4.2.3 MS/MS-Detektion von Anatoxin-a und Phenylalanin

Im Rahmen der tandemmassenspektrometrischen Detektion (API 365, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) von ANA und Phe nach positiver Ionisierung sollten divergierende Fragmentarisierungsmuster bei m/z 166 $[M+H]^+$ im PIS-Modus unter Variation der Ionisierungsspannung (IS: 2500 V, 3500 V, 4500 V), der Kollisionsenergie (CE: 10 V, 20 V, 30 V, 45 V, 60 V, 90 V, 120 V) und des Kollisionszellen-Austrittspotentials (CXP: 5 V, 25 V, 45 V) ermittelt werden. Im Rahmen der Untersuchungen wurde die Atmosphärendruck-Ionisierung im Turbo-Ionenspray-Modus (TIS) unter Verwendung von Stickstoff bei 400°C und 9 l min⁻¹ angewendet. Das Vernebelungsgas (NEB, N₂) und das Kollisionsgas (CAD) hatten eine Flussrate von 10 l min⁻¹ bzw. 2 l min⁻¹. Die Ionisierungsspannung war auf 3500 V, das *Declustering Potential* (DP) auf 20 V, das *Focussing Potential* (FP) auf 125 V und das *Entrance Potential* (EP) auf 6 V eingestellt. Die Kollisionsenergie und das Kollisionszellen-Austrittspotenzial betrugen im Rahmen der Referenzmethode 30 V bzw. 15 V.

4.4.3 Chromatografische Trennung eines Multitoxingemisches

Zur Optimierung der flüssigchromatografischen Trennung eines Multitoxingemisches wurden unterschiedliche stationäre Phasen hinsichtlich einer ausgewogenen Trennungseffizienz für cyanobakterielle Toxine höchst unterschiedlicher Polarität getestet. Zur Erhöhung der Retention der polaren Analyten (PSP-Toxine, ANA und CYN) war die Auswahl geeigneter HPLC-Säulen maßgeblich von der Stabilität unter Verwendung von 100 % wässrigen Eluenten abhängig. Im Gegensatz zur Referenzsäule Luna C18(2)

erfüllten die HPLC-Säulen Synergi® Polar-RP (Ether-linked Phenylphase), Synergi® Fusion-RP (Polar *embedded* C18-Phase), Luna Phenyl-Hexyl (-Phase), Luna PFP (Pentafluorphenylpropyl-Phase) und Aqua (C18-Phase mit *polar endcapping*) dieses Kriterium (sämtlich 250 x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Die mobile Phase enthielt 5 mM Ammoniumformiat und 53 mM Ameisensäure in Wasser (Eluent A) und Acetonitril/Wasser (90:10; v/v; Eluent B). Die Gradientenelution (0-5 min 0 % B, 9-18 min 60 % B, 27-29 min 100 % B, 30-40 min 0 % B) erfolgte bei einer konstanten Flussrate von 1 ml min⁻¹ (Split 7:3; Abfall/MS) unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Polarität der einzelnen Gruppen cyanobakterieller Toxine.

Zur Untersuchung des Einflusses des Ionenpaarbildners Tridecafluorheptansäure (TDFHA) gelangte eine mobile Phase bestehend aus 0,75 mM TDFHA und 0,375 mM Ammoniak in Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) mit unterschiedlichen Gradienten für die HPLC-Säulen Aqua (0 min 25 %B, 16-18 min 65 % B, 19-30 min 25 % B) und Synergi® Polar-RP (0-6 min 30 % B, 14-18 min 60 % B, 19-30 min 30 % B) von Phenomenex (Torrance, CA, USA) zum Einsatz.

4.4.4 Massenspektrometrische Detektion eines Multitoxingemisches nach chromatografischer Trennung

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte an einem API 165 Massenspektrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit Atmosphärendruck-Ionisierung im Turbo-Ionenspray-Modus (TIS) unter Verwendung von Stickstoff bei 400°C und 9 l min⁻¹. Das Vernebelungsgas (NEB, N₂) hatte eine Flussrate von 10 l min⁻¹, während die Ionisierungsspannung auf 3500 V eingestellt war. Das *Declustering Potential* (DP) war auf 20 V, das *Focussing Potential* (FP) auf 125 V und das *Entrance Potential* (EP) auf 6 V eingestellt. Unter positiver Ionisierung wurden die doppelt geladenen Ionen $[M+2H]^{2+}$ m/z (amu) = 512,7 (dm-MC-RR) und 519,7 (MC-RR) sowie die einfach geladenen Ionen $[M+H]^+$ m/z (amu) = 166,1 (ANA), 300,3 (STX), 416,4 (CYN), 896,5 (dm-MC-LA), 910,5 (MC-LA), 986,5 (MC-LF), 967,5 (dmdm-MC-LR), 981,5 (dm-MC-LR), 995,5 (MC-LR), 1025,5 (MC-LW), 1031,5 (dm-MC-YR) und 1045,5 (MC-YR) erfasst. Außerdem wurden im Rahmen der TDFHA-Methode PSP-Toxine gesondert bei m/z 257 (dcSTX), 300 (STX), 316 (NEO), 332 (GTX1/4, $[M+H - SO_3]^+$), 353 (dcGTX2/3), 396 (GTX2/3) und 412 (GTX1/4, $[M+H]^+$) detektiert.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) der cyanobakteriellen Toxine erfolgte auf der Basis des Signal/Rauschen (S/N)-Verhältnisses von 3:1.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter auf das Wachstum und die Toxinproduktion ausgewählter Cyanobakterien

5.1.1 Einfluss des Nitratgehaltes im Medium

Die anthropogene Gewässereutrophierung begünstigt maßgeblich das massenhafte Vorkommen von Cyanobakterien. In diesem Zusammenhang wird neben dem Phosphat-Gehalt der Gewässer vor allem ein hoher Stickstoff- bzw. Nitratgehalt als möglicher Wachstumsfaktor diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Stickstoffgehalts im MLA-Medium anhand der unterschiedlichen Nitrat-N-Gehalte von 0 mg l⁻¹ (N0), 41,2 mg l⁻¹ (N1), 82,4 mg l⁻¹ (N2), 123,6 mg l⁻¹ (N3, Kontrolle), 164,8 mg l⁻¹ (N4) und 247,2 mg l⁻¹ (N5) untersucht. Die N-limitierten Kulturen (N0) von *M. aeruginosa* AB2005/31 und *A. flos-aquae* SAG30.87 zeigten im Verlauf des Experiments einen Farbumschlag von dunkelgrün zu gelbgrün (Abb. 13) und produzierten signifikant weniger Biomasse (Abb. 14-15; Tab. 19-20 & 22-23, Anhang). Die mangelnde Fähigkeit zur N-Fixierung unter den gegebenen Laborbedingungen unterstreicht die Bedeutung des Stickstoffs für das Wachstum der Cyanobakterien. Die Kulturen mit den höchsten N-Gehalten (N4-5) von *M. aeruginosa* AB2005/31 flockten an der Oberfläche des Mediums schäumend auf. Dies könnte ein vermehrtes Vorkommen von Gasvakuolen signalisieren. Außerdem zeigten die *Microcystis*-Kulturen N4 und N5 einen Trend zu einer größeren Biomasseproduktion durch höhere Trockengewichte und Gehalte an Chlorophyll-*a*, jedoch ergab sich aufgrund der großen Standardabweichungen bzw. der begrenzten Anzahl an Wiederholungen (Triplikat) keine statistische Signifikanz ($\alpha = 0,05$) (Tab. 19-20, Anhang). Die Kulturen N1-5 von *A. flos-aquae* zeigten keine Unterschiede in der Biomasseproduktion und im Gehalt an Chlorophyll-*a* (Abb. 15; Tab. 22-23, Anhang). Die Microcystinproduktion aller *Microcystis*-Proben nahm schon nach 2 Wochen signifikant ab. Dabei zeigten die Proben mit den niedrigsten N-Gehalten (N0-1) signifikant höhere MC-Konzentrationen im Vergleich zu jenen mit den höchsten N-Gehalten (N3-5). Nach 4 Wochen sanken die MC-Gehalte weiter, nur die N5-Kulturen zeigten einen Anstieg der MC-Produktion. Zum Ende des Experiments stiegen die MC-Gehalte wieder auf etwa 500 µg g⁻¹ Trockengewicht. Während die N1-Kulturen nach 6 Wochen die höchsten MC-Gehalte (> 700 µg g⁻¹) aufwiesen, zeigten die N0-Kulturen, in Übereinstimmung mit dem geringen Wachstum, signifikant niedrigere MC-Gehalte (< 200 µg g⁻¹). Bezüglich des MC-Profiles fällt auf, dass die N0-Kulturen nach 6 Wochen nur noch 3 (MC-RR, -LA, -LR) von vormals 7 MC-Varianten produzierten. Darüber hinaus wurden keine signifikanten

Veränderungen in der Relation der MC-Varianten beobachtet (Abb. 16, Tab. 21, Anhang). Die Verteilung der MC-Ausbeute war dergestalt, dass sowohl niedrige (N1) als auch hohe Nitrat-Gehalte (N5) die höchste Toxinausbeute aufwiesen (Abb. 17, Tab. 44, Anhang).

Abb. 13 Phänotyp von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei unterschiedlichen Nitratgehalten im Medium

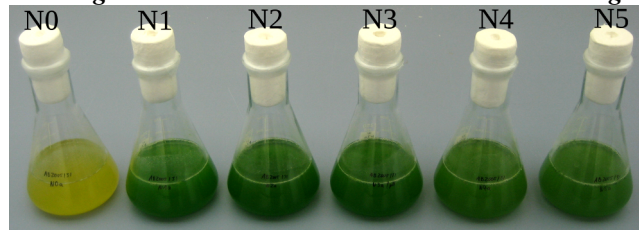


Abb. 14 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei variablen Nitratgehalten im Medium

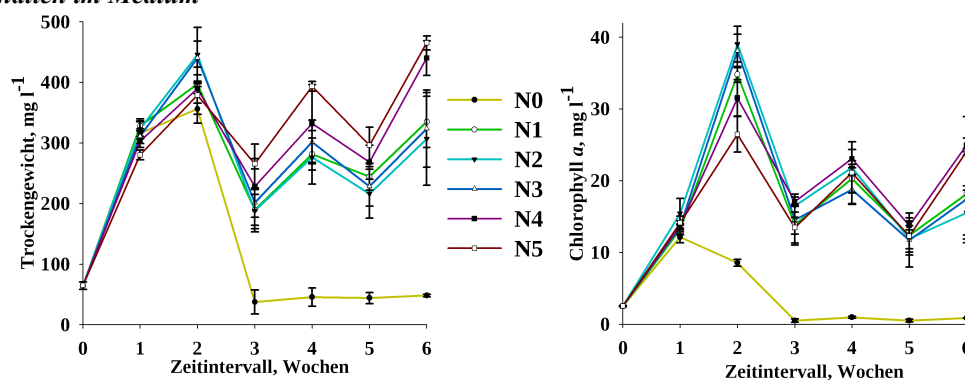
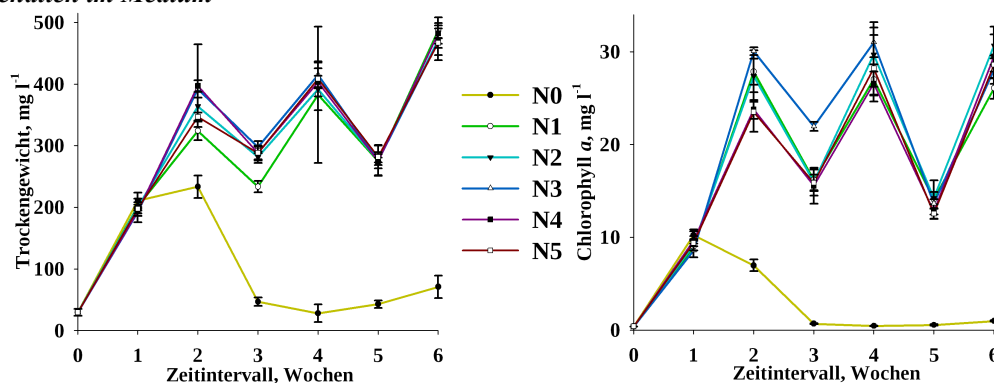


Abb. 15 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87 bei variablen Nitratgehalten im Medium



Infolge der großen Variation der MC-Gehalte zwischen den 3 Replikaten einer Konzentrationsstufe (Standardabweichungen von 25-73 %, Woche 6) kann eine gesicherte Aussage über den Einfluss unterschiedlicher N-Gehalte auf die Toxinproduktion nicht getroffen werden, so dass die Ergebnisse keine Empfehlungen für eine optimale Nitrat-Konzentration im Medium nahelegen. Indes wurde deutlich, dass die Toxinproduktion von *M. aeruginosa* AB2005/31 eine geeignete Stickstoffquelle im Medium voraussetzt.

Die Stammkultur von *A. flos-aquae* SAG30.87 hatte vor Beginn des Experiments (Woche 0) eine ANA-Konzentration von 4797,6 $\mu\text{g g}^{-1}$. Schon nach 2 Wochen konnte ANA in keiner der Proben (N0-5) mehr nachgewiesen werden. Der Verlust der Toxizität war

nicht abhängig von der Nitrat-Konzentration im Medium, vielmehr ist das Phänomen für *A. flos-aquae* SAG30.87 unter Laborbedingungen wenig beeinflussbar.

Abb. 16 Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei variablen Nitratgehalten im Medium

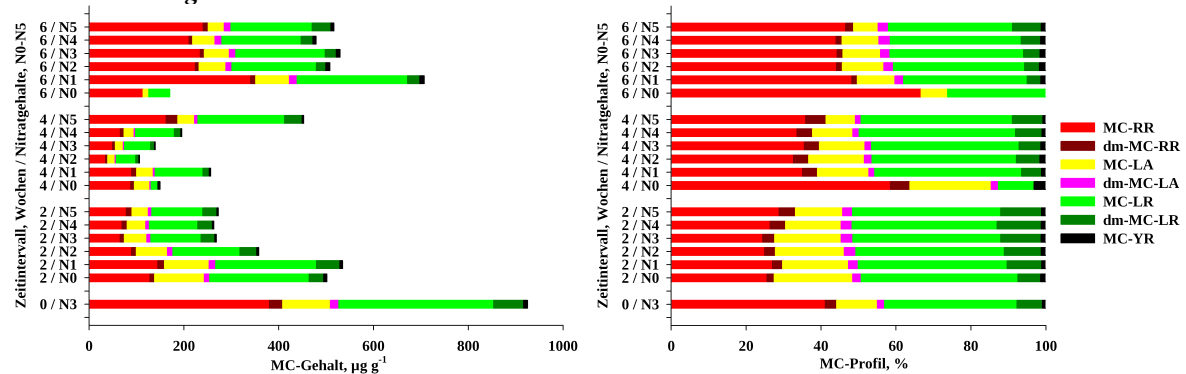
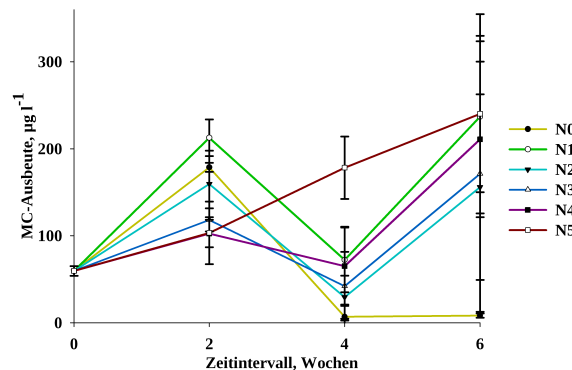


Abb. 17 MC-Ausbeute von *M. aeruginosa* AB2005/31 je Liter Kulturmedium bei variablen Nitratgehalten



5.1.2 Einfluss des Phosphatgehaltes im Medium

Zur Untersuchung des Einflusses des Phosphor-Gehaltes auf das Wachstum und die Toxinproduktion von Cyanobakterien wurden die unterschiedlichen Phosphat-P-Konzentrationen von $0,6 \text{ mg l}^{-1}$ (P1), $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ (P2), $6,0 \text{ mg l}^{-1}$ (P3) und $9,0 \text{ mg l}^{-1}$ (P4) studiert. Alle Kulturen wuchsen bis zur zweiten Woche des Experiments zügig und ohne farbliche Abweichungen. Im Vergleich zur tiefgrünen Färbung der Kulturen P2-4 zeigte jedoch P1 im Verlauf des Experiments einen Umschlag zu einer gelbgrünen Färbung, die sich bei *Anabaena* und *Microcystis* gleichermaßen in signifikant niedrigeren Gehalten an Chlorophyll-*a* äußerte, nicht jedoch im Trockengewicht der Cyanobakterien (Abb. 18-20; Tab. 24-25 & 27-28, Anhang). Nur ein Replikat der P3-Kultur von *M. aeruginosa* produzierte zum Ende des Experiments deutlich weniger Biomasse als die übrigen Replikate und verursachte einen erheblichen Anstieg der Standardabweichung (Tab. 24, Anhang). Trotz niedriger Gehalte an Chlorophyll-*a* zeigten die P1-Kulturen mit den niedrigsten Phosphat-Gehalten eine Tendenz zu einer etwas größeren Biomasseproduktion

als die Kulturen P2-4. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass sich die Trockenmasse, im Vergleich zum Gehalt an Chlorophyll-*a*, zur Bestimmung des Wachstums der Cyanobakterien wesentlich besser eignet.

Abb. 18 Phänotyp von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei unterschiedlichen Phosphatgehalten im Medium

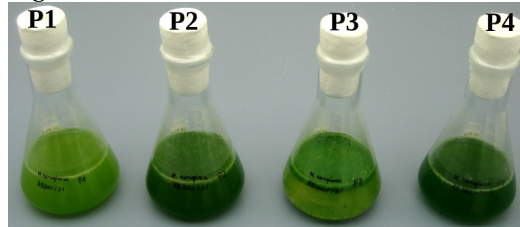


Abb. 19 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-*a* von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei variablen Phosphatgehalten im Medium

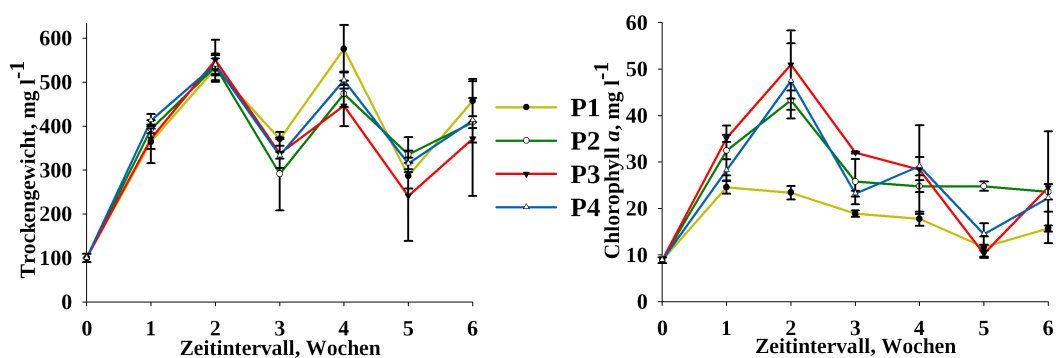
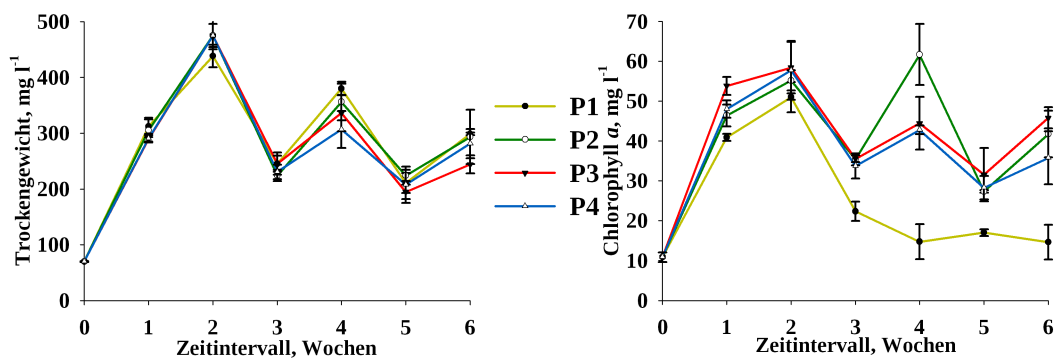


Abb. 20 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-*a* von *A. flos-aquae* SAG30.87 bei variablen Phosphatgehalten im Medium



Die Chlorophyll-Biosynthese der Cyanobakterien wird maßgeblich vom Phosphat-Angebot im Medium limitiert. Insbesondere könnten geringe Phosphat-Konzentrationen die Bildung der energiereichen Nukleotidphosphate Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat (NADPH) hemmen, denen eine große Bedeutung nicht nur bezüglich der Biosynthese des Chlorophylls zukommt.

Die Microcystis-Stammkultur (P3) hatte zu Beginn des Experiments eine MC-Konzentration von 1098 $\mu\text{g g}^{-1}$. Diese Kontrolle (P3) zeigte im Verlauf des Experiments konstante Toxingehalte. Die Phosphat-limitierte Kultur (P1) mit einer 10-fach geringeren Phosphat-Konzentration als die Kontrolle hatte indes die höchsten MC-Gehalte. Diese

Tendenz war gegenüber P2 und P4 statistisch signifikant (Abb. 21; Tab. 26, Anhang). Aufgrund der hohen Biomasseproduktion der P1-Kulturen war auch die MC-Ausbeute der Phosphat-limitierten Kulturen am höchsten. Die P4-Kultur mit der höchsten Phosphat-Konzentration (9 mg l^{-1}) hatte hingegen die geringste MC-Ausbeute je Liter Medium (Abb. 22; Tab. 44, Anhang). Das quantitative Verhältnis der unterschiedlichen MC-Varianten stand zumeist im entsprechenden Verhältnis zum Gesamt-MC-Gehalt. Die MC-RR-Gehalte der Phosphat-limitierten Kulturen zeigten jedoch in Relation zum Gesamt-MC-Gehalt ein größeres prozentuales Vorkommen der Arginin-reichen Peptide MC-RR und dm-MC-RR. Unterschiede im MC-Profil bezüglich der Desmethylierung von MCs wurden nicht beobachtet, so dass von einem Einfluss des Phosphatgehaltes im Medium auf die Desmethylierung von Microcystinen nicht auszugehen ist. Die Ergebnisse des Phosphatexperiments legen aber Spekulationen bezüglich der ökologischen Bedeutung der Microcystine nahe, da die Biosynthese der als eukaryotische Proteinphosphatase-Inhibitoren wirkenden zyklischen Peptide bei hohen Phosphat-Konzentrationen im Medium weniger ausgeprägt ist als bei niedrigen PO_4^{3-} -Gehalten. Möglicherweise könnte, falls die Synthese von Microcystinen der Abwehr eukaryotischer Frassfeinde dient, der toxische Mechanismus der Hyperphosphorylierung von Proteinen unter Phosphatlimitierung eine weniger starke Ausprägung erfahren. Demnach wäre eine gesteigerte MC-Produktion ein Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Toxizität gegenüber Frassfeinden unter Bedingungen der Phosphatlimitierung. Eine weitere Hypothese stützt sich auf die Annahme, dass die Biosynthese der Microcystine durch Cyanobakterien evolutionsgeschichtlich weitaus älter ist als die Entstehung von Eukaryoten. Demnach könnte die biologische Funktion der MC-Produktion weniger eine ökologische als vielmehr eine physiologische Bedeutung für die Cyanobakterien haben. Da die Biosynthese von MCs und NOD mit einem ABC-Transporter (ATP binding cassette) assoziiert ist, der als Peptid-Exporter fungiert (Pearson et al. 2004, Moffitt & Neilan 2004), könnte der Zell-Export von MCs im Zusammenhang mit der Stickstoff-Exkretion stehen. Lehtimäki (2000) berichtete in diesem Zusammenhang, dass nicht nur die absolute Zufuhr von Stickstoff und Phosphor das Wachstum der Cyanobakterien beeinflusst, sondern beide Nährstoffe in einem adäquaten Verhältnis ($\text{N:P} = 32:1$, molare Relation) vorliegen müssen. Die Phosphatlimitierung des Mediums könnte folglich einen Stickstoffüberschuss implizieren, der möglicherweise durch eine erhöhte MC-Exkretion kompensiert werden könnte. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Phosphat-limitierten *Microcystis*-Kulturen vermehrt das stickstoffreiche MC-RR

produzieren (Abb. 21). Demgegenüber wird insbesondere dem Cyanophycin, einem Copolymer aus Asparaginsäure und Arginin, das bis zu 10 % der Zellmasse von Cyanobakterien ausmachen kann, die Bedeutung der Stickstoffspeicherung zugeschrieben (Madigan & Martinko 2006).

Die Kulturen von *Anabaena* produzierten schon nach 2 Wochen kein Anatoxin-a mehr, und auch im Verlauf des Experiments wurde die Fähigkeit zur Produktion des Neurotoxins nicht wiedererlangt. Im Falle, dass die Stammkultur noch ANA produzierte, verlor *A. flos-aquae* SAG30.87 innerhalb von 2 Wochen die Fähigkeit zur Toxinproduktion vollständig. Der *Strain* scheint für Untersuchungen bezüglich des Einflusses unterschiedlicher Wachstumsfaktoren auf die ANA-Produktion wenig geeignet zu sein.

Abb. 21 Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei variablen Phosphatgehalten im Medium

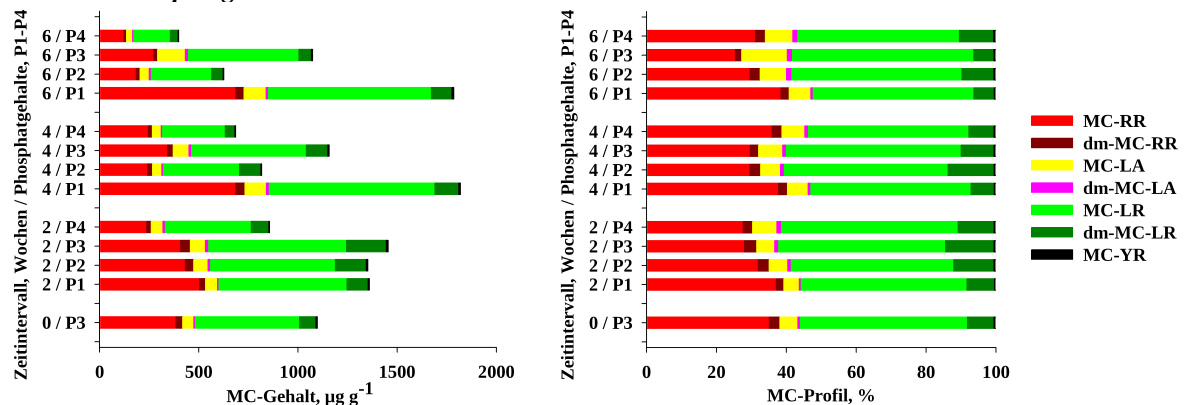
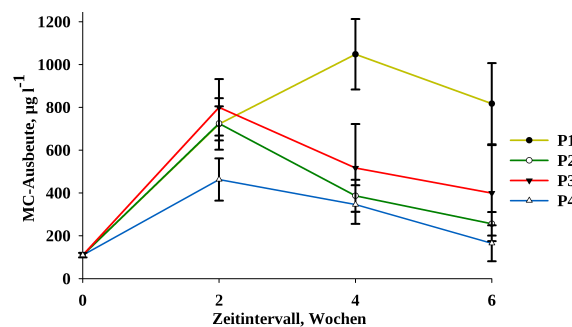


Abb. 22 MC-Ausbeute von *M. aeruginosa* AB2005/31 je Liter Kulturmedium bei variablen Phosphatgehalten



5.1.3 Einfluss des pH-Wertes im Medium

Der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum und die Toxinproduktion ausgewählter Cyanobakterien wurde vergleichend bei pH 7,5, 9,2 und 10,5 studiert. Die cyanobakteriellen Kulturen mit einem pH-Wert von 7,5 im Medium zeigten schon nach einer Woche eine gelbliche Färbung und eine signifikant geringere Biomasse-Produktion bezüglich des Trockengewichts und des Gehaltes an Chlorophyll-a, wohingegen die

Kulturen mit pH 9,2 und pH 10,5 dunkelgrün gefärbt waren (Abb. 23-25; Tab. 29-30 & 32-33, Anhang). Während *M. aeruginosa* AB2005/31 eine deutliche Tendenz bezüglich eines angeregten Wachstums bei dem höchsten pH-Wert von 10,5 erkennen ließ, waren bei *A. flos-aquae* SAG30.87 keine Wachstumsunterschiede zwischen den beiden alkalischen pH-Werten 9,2 und 10,5 nachweisbar (Abb. 24-25; Tab. 29-30 & 32-33, Anhang).

Abb. 23 Phänotyp von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei unterschiedlichen pH-Werten im Medium

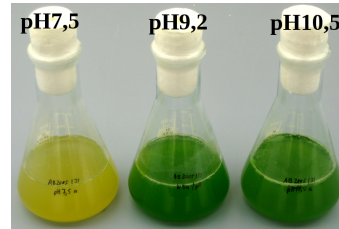


Abb. 24 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei variablem pH-Wert im Medium

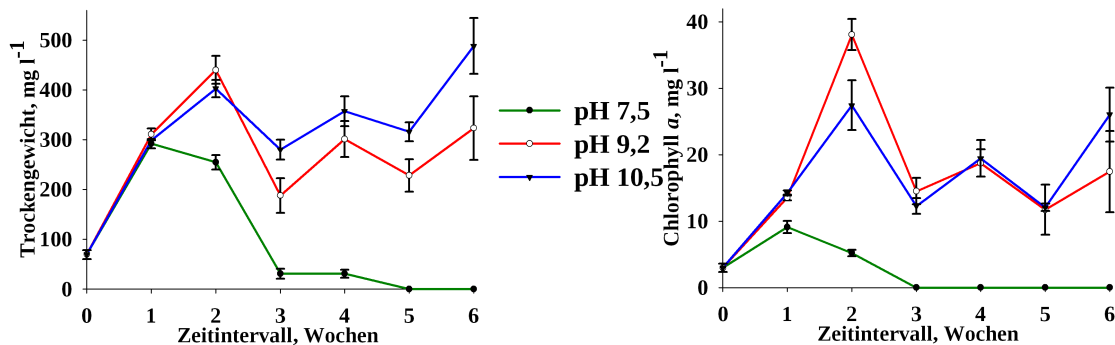
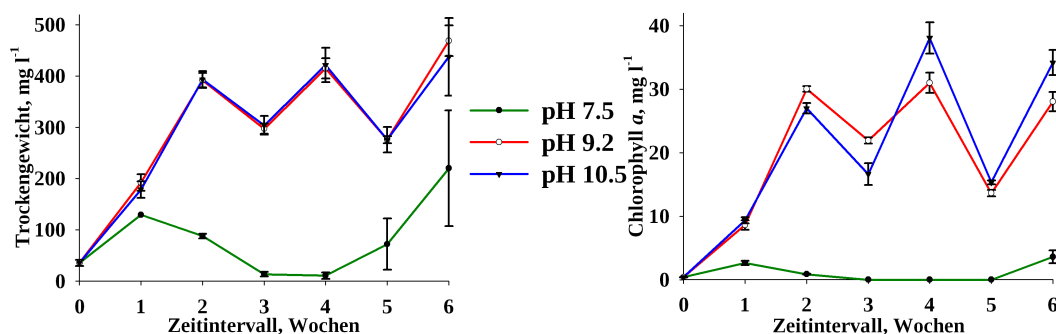


Abb. 25 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87 bei variablem pH-Wert im Medium



Die Cyanobakterien im Medium mit dem höchsten pH-Wert zeigten ferner eine erhöhte Koagulation der Zellen sowie eine starke Blasen- und Schaumbildung. Dies erschwerte die Zentrifugation der Cyanobakterien während der Zellernte. Die Kulturen mit neutralem pH-Wert produzierten nach 4 Wochen annähernd keine Biomasse mehr. Während *M. aeruginosa* AB2005/31 einging, konnte *A. flos-aquae* sich nach 6 Wochen wieder etwas erholen, so dass der Chlorophyll-Gehalt und das Trockengewicht wieder zunahm. Im Vergleich zu den Kulturen mit pH 9,2 und pH 10,5 blieben die Wachstumsparameter signifikant erniedrigt. Unabhängig vom pH-Wert des Mediums wurde in allen *Microcystis*-

Kulturen nach 2 Wochen eine signifikante Abnahme der MC-Konzentrationen gemessen. Nach 4 Wochen zeigte die Kultur mit dem höchsten pH-Wert signifikant höhere MC-Gehalte als die Kontrolle (pH 9,2). Dieser Unterschied war bereits nach 6 Wochen nivelliert (Abb. 26; Tab. 31, Anhang). Gleichwohl war die MC-Ausbeute für die Kulturen mit dem höchsten pH-Wert am größten (Abb. 27; Tab. 44, Anhang).

Abb. 26 Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine von *M. aeruginosa* AB2005/31 bei variablen pH-Werten im Medium

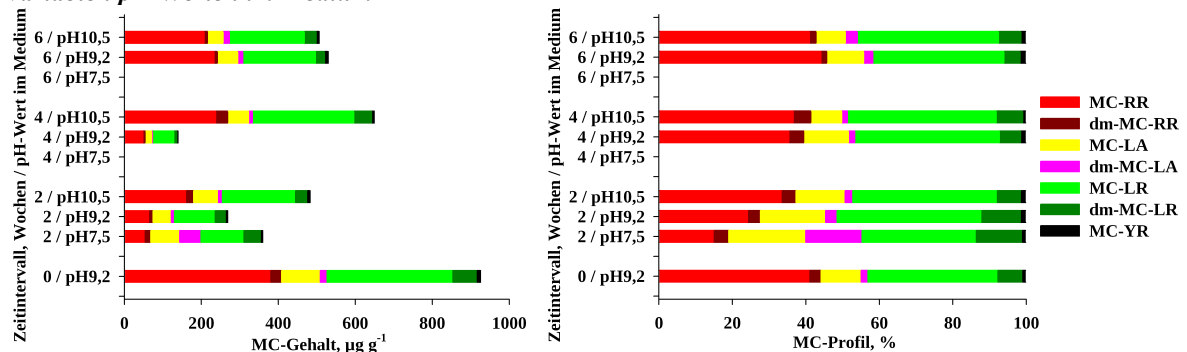
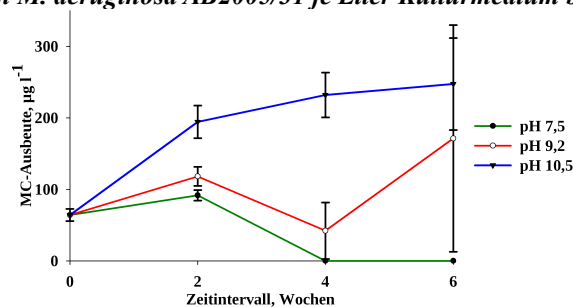


Abb. 27 MC-Ausbeute von *M. aeruginosa* AB2005/31 je Liter Kulturmedium bei variablen pH-Werten



Allgemein kann geschlossen werden, dass ein alkalischer pH-Wert das Wachstum und die Microcystin-Produktion von *M. aeruginosa* AB2005/31 fördert. Interessanterweise zeigten die Kulturen mit pH 7,5 bezüglich des MC-Profiles nach 2 Wochen ein im Verhältnis höheres Auftreten von desmethylierten Microcystinen, insbesondere dm-MC-LA war signifikant erhöht (Abb. 26; Tab. 31, Anhang). Leider konnte der Verlauf nach 4 Wochen nicht weiter verfolgt werden, da die Kulturen im neutralen Medium keine Biomasse mehr produzierten. Dies ist auch vor dem Hintergrund der *Microcystis*-Blüten im Senftenberger See 2005 und 2006 interessant. Im Zuge der Gewässerüberwachung wurde das dominante Vorkommen desmethylierter Microcystine beobachtet (siehe 5.3.3). Trotz niedriger pH-Werte von 4-6 (je nach Standort der Messungen) kam es zum Massenvorkommen von *M. aeruginosa*. Die Datenlage bezüglich des Einflusses des pH-Werts auf die Desmethylierung von MCs ist jedoch noch zu gering um gesicherte Einschätzungen geben zu können. Die Stammkultur von *A. flos-aquae* SAG30.87 produzierte vor Beginn des Experiments 4797 $\mu\text{g ANA je g}$. Ab der 2. Woche produzierten die *Anabaena*-Kulturen

unter den alkalischen pH-Werten 9,2 (Kontrolle) und 10,5 kein ANA mehr, wohingegen die Triplikate bei pH 7,5 ANA-Gehalte von $3763,1 \pm 748,1 \mu\text{g g}^{-1}$ aufwiesen (Tab. 34, Anhang). Aufgrund der zu geringen Biomasse der Cyanobakterien im neutralen Medium konnte der ANA-Gehalt nach 4 Wochen nicht ermittelt werden. Zum Ende des Experiments zeigten die Kulturen bei pH 7,5 geringe und stark variierende ANA-Konzentrationen zwischen 0,9 und $37,3 \mu\text{g g}^{-1}$. Während *A. flos-aquae* SAG30.87 ein alkalisches Milieu für ein adäquates Wachstum benötigt, wurde Anatoxin-a nur bei dem geringsten pH-Wert 7,5 nachgewiesen. Da auch hier die Konzentrationen des Neurotoxins im Verlauf des Experiments rapide abnahmen, kann postuliert werden, dass ein niedriger pH-Wert möglicherweise einen Stressfaktor darstellt, der die Abnahme der ANA-Produktion unter Laborbedingungen zumindest hinauszögert, wenn auch nicht verhindert. Gleichsam ist die ANA-Ausbeute bei pH 7,5 aufgrund der geringen Produktion von Biomasse äußerst gering.

5.1.4 Einfluss von gebrauchtem Medium

Zur Untersuchung allelopathischer Effekte wurde der Einfluss des gebrauchten Mediums von *Synechocystis sp.* SAG92.79 auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *M. aeruginosa* AB2005/31 und *A. flos-aquae* SAG3087 untersucht. Nach 2 Wochen waren bei *M. aeruginosa* AB2005/31 keine sichtbaren Unterschiede zwischen den Kontrollen (MLA_N) und den Kulturen mit 50 % gebrauchtem Medium von *Synechocystis sp.* SAG92.79 (GM) sichtbar. Nach 3 Wochen zeigten die GM-Kulturen von *M. aeruginosa* AB2005/31 eine dunklere Färbung und produzierten signifikant mehr Biomasse. Bis zum Ende des Experiments setzte sich diese Tendenz ohne statistische Signifikanz fort (Abb. 28; Tab. 35-36, Anhang). Ab der 5. Woche schien die GM-Kultur eine hellere Grünfärbung zu entwickeln. Diese Beobachtung ließ sich anhand der Gehalte an Chlorophyll-*a* nachweisen. Die extrazellulären Produkte des Cyanobakteriums *Synechocystis sp.* SAG92.79 scheinen einen Effekt auf das Wachstum von *M. aeruginosa* AB2005/31 zu haben. Der Einfluss von *Synechocystis sp.* SAG92.79 auf das Wachstum von *A. flos-aquae* SAG30.87 zeigte hingegen eine inhibierende Tendenz, da die Kontrollen etwas höhere Trockengewichte und Gehalte an Chlorophyll-*a* aufwiesen (Abb. 29; Tab. 38-39, Anhang). Auch der optische Eindruck der Kulturen ergab eine Schaumbildung und eine tiefere Grünfärbung der Kontrollen. Indes fördert das gebrauchte Medium die Biosynthese der Microcystine nicht, vielmehr sanken die MC-Gehalte unabhängig von der Zusammensetzung des Mediums signifikant ab.

Abb. 28 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31 in MLA_N -Medium und 50 % gebrauchtem Medium (GM) von *Synechocystis* sp. SAG92.79

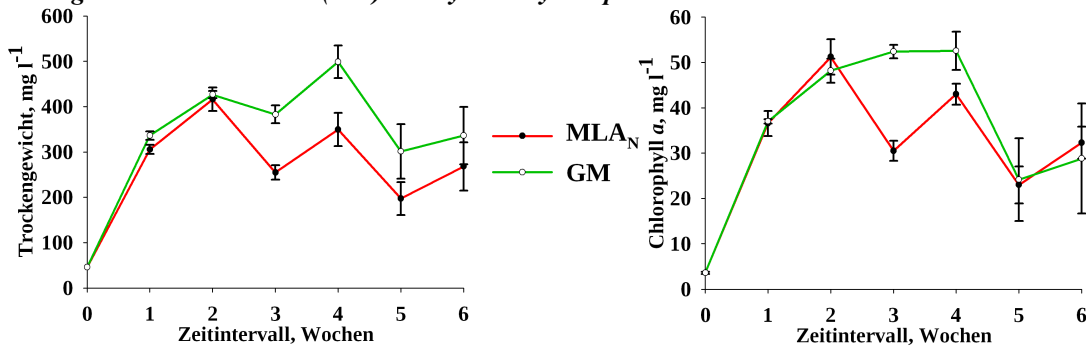


Abb. 29 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87 in MLA_N -Medium und 50 % gebrauchtem Medium (GM) von *Synechocystis* sp. SAG92.79

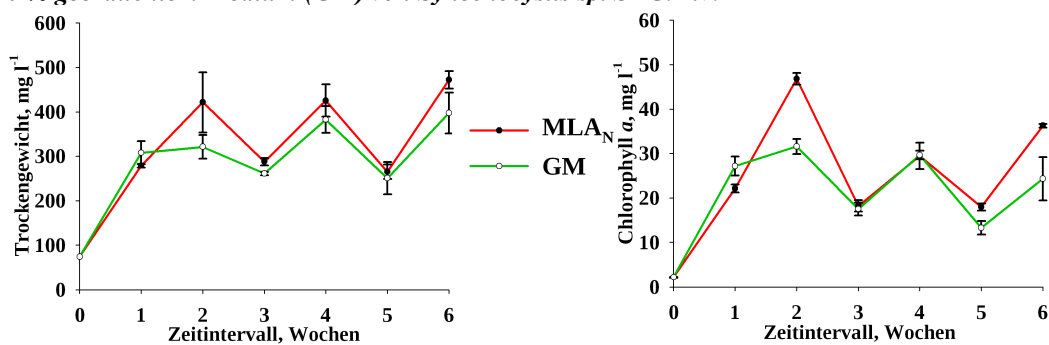


Abb. 30 Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine von *M. aeruginosa* AB2005/31 in MLA_N -Medium und 50 % gebrauchtem Medium (GM) von *Synechocystis* sp. SAG92.79

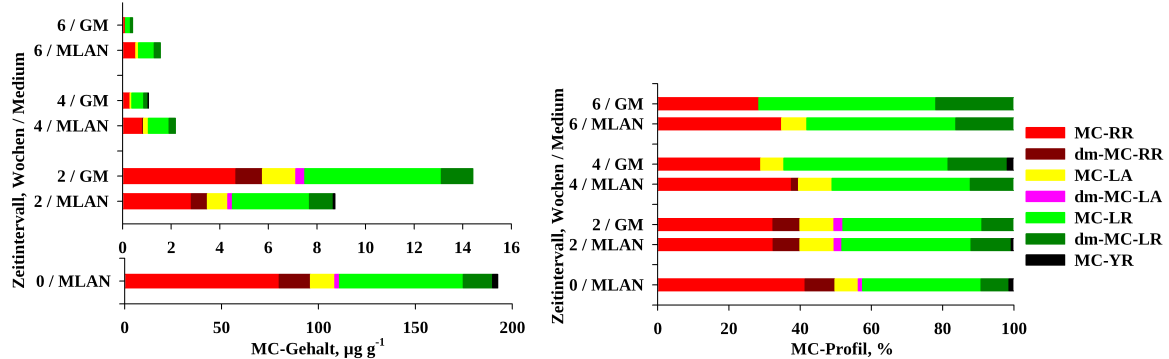
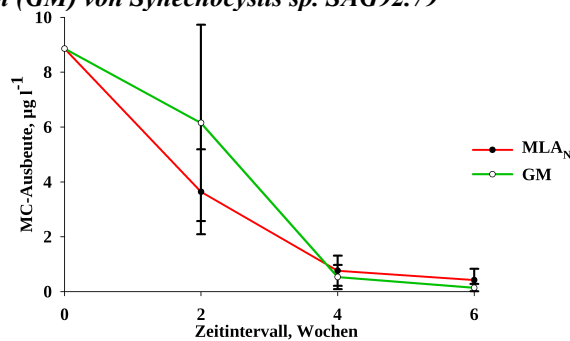


Abb. 31 MC-Ausbeute von *M. aeruginosa* AB2005/31 je Liter Kulturmedium in MLA_N -Medium und 50 % gebrauchtem Medium (GM) von *Synechocystis* sp. SAG92.79



Während die GM-Kultur relativ zur Kontrolle (MLA_N) nach 2 Wochen eine Tendenz zu höheren MC-Gehalten aufwies, fielen diese in der 4. Woche hinter jene der Kontrolle zurück (Abb. 30; Tab. 37, Anhang). Hinsichtlich der Toxinausbeute konnten im Vergleich

der beiden Medien keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abb. 31; Tab. 44, Anhang). In sämtlichen Proben von *A. flos-aquae* SAG30.87 war Anatoxin-a nicht detektierbar.

5.1.5 Einfluss der Kryopreservation

In diesem Experiment sollte das Potential der Kryopreservation, dauerhafte Lagerungszeiten ohne Toxizitätsverluste zu erreichen, ermittelt werden. Nach dem Entfernen der Alufolie (2 Tage nach dem Auftauen der Zellen) zeigten alle Proben von *Anabaena* und *Microcystis* eine grünliche Färbung als Indikator für ihre Vitalität. Optische Unterschiede zwischen den je 3 Replikaten wurden im Vergleich der nunmehr dunkelgrün gefärbten Kulturen auch nach 2 Wochen nicht beobachtet. Alle Kulturen zeigten eine sichtbare Zunahme der Biomasse. Die Trockenmasse und der Gehalt an Chlorophyll-*a* von *M. aeruginosa* AB2005/31 stieg zwischen der 3. und 4. Woche nach dem Auftauen der Zellen signifikant an (Abb. 32; Tab. 40-41, Anhang). Geringe Standardabweichungen (< 5 %) zwischen den Replikaten deuteten auf ein reproduzierbares Wachstum nach dem Gefrier-Tau-Zyklus hin. Auch in den Kulturen von *A. flos-aquae* SAG30.87 war eine tendenzielle Zunahme der Biomasse zu beobachten (Abb. 33; Tab. 42-43, Anhang).

Die MC-Gesamtgehalte der *Microcystis*-Replikate (Abb. 32) wiesen 4 Wochen nach dem Gefrier-Tau-Zyklus hohe Variationen auf. Obwohl zufällige Abweichungen nicht auszuschließen sind, fällt in diesem Zusammenhang auf, dass die Proben gleichzeitig bei 37°C aufgetaut wurden, die folgenden Waschschrte zur Entfernung des Kryoprotektanten DMSO jedoch nacheinander erfolgten. Die Aufreinigung einer Probe beanspruchte etwa 3 Minuten. Dies führte zu einer permanent steigenden Exposition der aufgetauten Replikate 2 und 3 gegenüber dem zytotoxisch wirkenden DMSO. Obwohl weder die optische Erscheinung der Kulturen noch die untersuchten Wachstumsparameter Unterschiede oder gar zytotoxische Effekte erkennen ließen, war die Toxinproduktion in Abhängigkeit von der Expositionsdauer deutlich gehemmt. Während das unverzüglich aufgereinigte Replikat (1) 1534,3 µg g⁻¹ MCs enthielt, waren im Replikat (2) 551,3 µg g⁻¹ MCs und im Replikat (3) nur 153,4 µg g⁻¹ MCs nachweisbar (Abb. 32). Da ein statistischer Fehler auszuschließen ist, könnte DMSO möglicherweise die Genexpression der *mcy*-Gene beeinflussen. Dies kann aber nur durch weiterführende Untersuchungen einschließlich des Einsatzes molekularbiologischer Methoden aufgeklärt werden. Gleichwohl lässt sich aber bereits jetzt konstatieren, dass die Aufrechterhaltung der Microcystinproduktion maßgeblich von einer schnellen Entfernung des Kryoprotektanten abhängt.

Abb. 32 Trockengewicht, Gehalt an Chlorophyll-a und Microcystin-Gesamtgehalte von *M. aeruginosa* AB2005/31 nach einem Gefrier-Tau-Zyklus

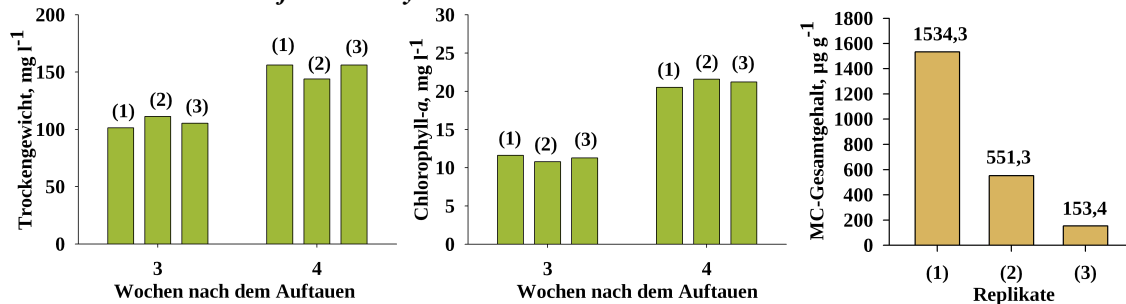
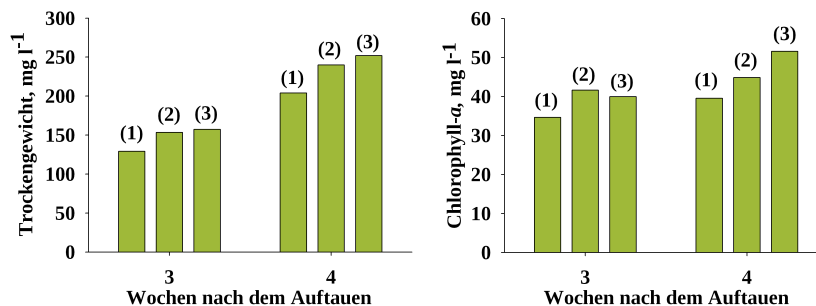


Abb. 33 Trockengewicht und Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87 nach einem Gefrier-Tau-Zyklus



In allen Experimenten wurde die allgemeine Tendenz einer Abnahme der Toxinproduktion im Verlauf der Kultivierung der Cyanobakterien beobachtet. Während die Stammlösung von *M. aeruginosa* AB2005/31 im März 2008 noch einen MC-Gehalt von 1097,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ aufwies, wurden im Mai (2008) 925,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ und im September (2008) nur noch 192,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ detektiert. Der Einfluss der Gefrierkonservierung auf die Produktion von Anatoxin-a konnte nicht untersucht werden, da die Stammkultur von *A. flos-aquae* SAG30.87 die Fähigkeit zur Toxinproduktion unter Laborbedingungen ungleich rasanter verlor, zuweilen binnen weniger Tage bis Wochen ohne Wachstumsrückgänge oder Fremdkontaminationen. Der Verlust der Toxinproduktion unter Bedingungen der Kultivierung von Cyanobakterien scheint indes ein bekanntes Phänomen zu sein, dessen Ursachen jedoch bisher nicht geklärt sind: Park et al. (1993) berichteten von 2 *Microcystis*-Strains, die vormals 350 bzw. 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ ANA produzierten, während nach 3 Kultivierungszyklen nur noch Spuren des Neurotoxins nachweisbar waren. Wood et al. (2008) dokumentierten, dass das Cyanobakterium *Phormidium autumnale* noch im April 2007 ANA und HANA produzierte, während diese Toxine im September des gleichen Jahres nicht mehr detektierbar waren. Auch Gallon et al. (1994) berichteten, dass ein Strain von *Anabaena flos-aquae* nach einer gewissen Kultivierungsdauer die Biosynthese von ANA einstellte. Unabhängig davon lassen die hier vorgestellten Ergebnisse den Schluss zu, dass die Methode der Gefrierkonservierung bei fachgerechter und schneller Durchführung sehr hilfreich im Hinblick auf eine permanente Toxinproduktion ist.

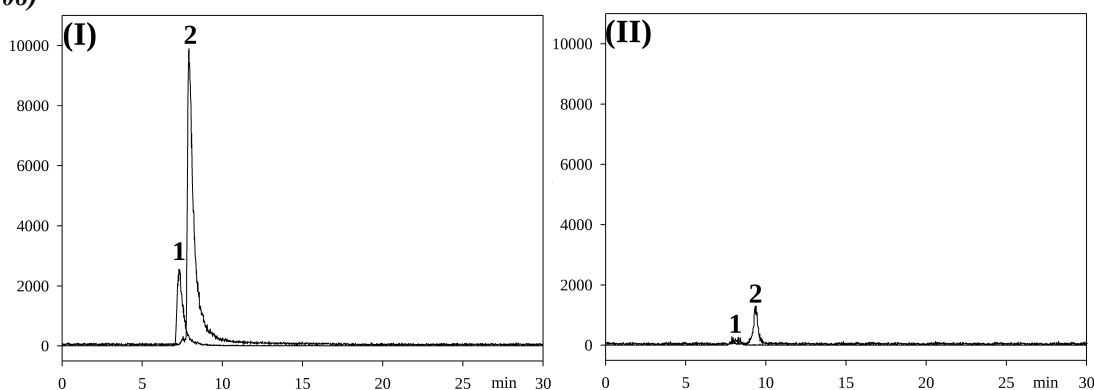
5.2 Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS-basierten Methode zur Bestimmung von BMAA und DAB in Cyanobakterien

5.2.1 Chromatografische Trennung

Die flüssigchromatografische Trennung auf der Basis der hydrophilen Interaktion (HILIC) stellt eine zukunftsweisende Methode zur Analytik von underivatisierten nichtproteinogenen Aminosäuren dar. Die entwickelte LC-MS/MS-Methode zur selektiven und sensitiven Bestimmung von BMAA und DAB zeichnet sich unter Anwendung der HPLC-Säule Luna HILIC (250 x 4,6 mm, 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) durch hohe Reproduzierbarkeit und Stabilität der chromatografischen Trennung aus und ist für verschiedene Matrices (Cyanobakterien, Pflanzensamen) gut geeignet. Dabei hatte die Optimierung der mobilen Phase einen erheblichen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit der Methode. Die Verwendung von Acetonitril ermöglicht gegenüber Methanol eine 8-10-fache Minimierung der Nachweisgrenze. Der Zusatz von Essigsäure anstelle von Ameisensäure ergab eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit für die reinen Standardsubstanzen (BMAA, DAB), jedoch benötigt man für die Analyse der hydrolysierten Proben eine adäquate Pufferung durch Zusatz des jeweiligen Ammoniumsalzes der eingesetzten organischen Säure. Allerdings sinkt die Nachweisempfindlichkeit, je höher der pH-Wert und die Konzentration des Ammoniumsalzes in der mobilen Phase sind. Der niedrigere pKs-Wert eines Ameisensäure-Formiat-Puffers (3,77) ermöglicht im Vergleich zu einem Essigsäure-Acetat-Puffer (4,76) die Elution bei einem geringeren pH-Wert. Dabei war der Zusatz von 2 mM Ammoniumformiat (pH 3; Ameisensäure) ausreichend, um die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Retentionszeiten für BMAA und DAB zu gewährleisten und die Nachweisgrenze deutlich zu senken. Es resultiert zwar eine erhöhte Trennleistung nach einer Reduktion der Elutionskraft der mobilen Phase, jedoch verbunden mit einer verminderten Nachweisempfindlichkeit aufgrund der Peakverbreiterung durch längere Retentionszeiten. Dennoch ermöglicht die tandemmassenspektrometrische Detektion den sensitiven und selektiven Nachweis beider nichtproteinogenen Aminosäuren. Im Vergleich zur Methode von Rosén und Hellenäs (2008), bei der eine ZIC[®]-HILIC-Säule (SeQuant, Umeå, Schweden) eingesetzt wird, konnte unter den o.g. chromatografischen Bedingungen und einer Injektion von 40 ng BMAA und 10 ng DAB die Nachweisempfindlichkeit etwa um den Faktor 8 verbessert werden (Abb. 34), während bei Anwendung der HPLC-Säule TSK-gel Amide-80 (Tosoh, Tokio, Japan) im Rahmen der Methode von Kubo et al. (2008) und Einsatz des Tandemmassenspektrometers API 365 (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA) weder 40 ng BMAA noch 10 ng DAB nachweisbar waren. Alle Methoden wurden unter konstanten Bedingungen in mindestens 3 chromatografischen Läufen vergleichend getestet. Dabei zeigte sich, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode den anderen Methoden eindeutig überlegen war, sodass sie in der Folgezeit zur Untersuchung von 62 cyanobakteriellen Proben eingesetzt wurde.

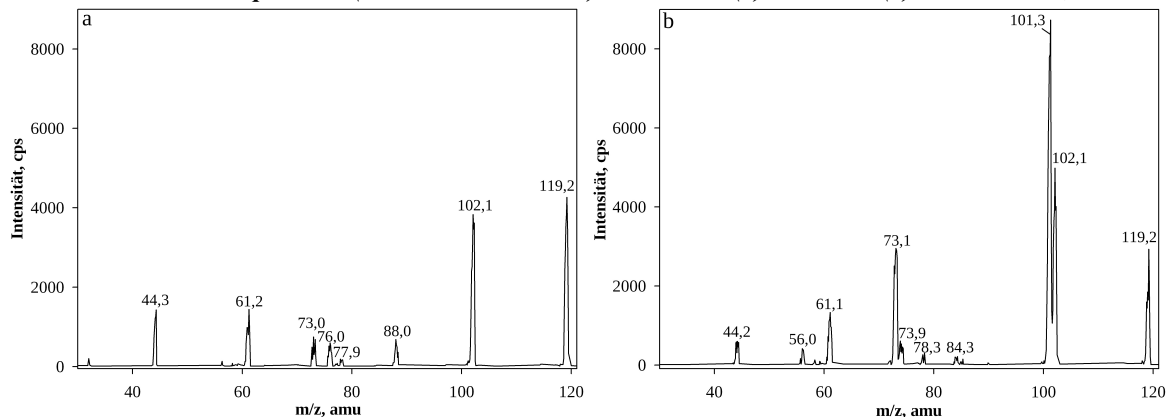
Abb. 34 (I) Flüssigchromatografische Trennung und tandemmassenspektrometrische Detektion von (1) 40 ng L-BMAA (7,29 min) und (2) 10 ng DL-2,4-DAB (7,93 min) bei $m/z = 119,1 > 88,0$ amu (BMAA) und $119,1 > 101,3$ amu (DAB) im Vergleich mit der HILIC-MS/MS-Methode (II) von Rosén & Hellenäs (2008)



5.2.2 Tandemmassenspektrometrische Detektion von BMAA und DAB

Spezifische Produkt-Ionen des *Precursor*-Ions m/z 119,1 amu wurden im PIS-Modus zur eindeutigen Identifikation von BMAA und DAB ermittelt. Charakteristische Fragmente für BMAA sind m/z 76,0 $[M+H - CH_2=N-CH_3]^+$ und 88,0 amu $[M+H - CH_3-NH_2]^+$. DAB ist bei m/z 56,0 $[M+H - HCOOH - NH_3]^+$, 73,9 $[M+H - CH_2-CH_2-NH_2]^+$ und 101,3 amu $[M+H - H_2O]^+$ spezifisch nachweisbar. Beide Aminosäuren weisen weitere Produkt-Ionen bei m/z 44,2 $[CH_3-NH=CH_2]^+$ bzw. $[CH_2=CH_2-NH_2]^+$, 61,2 [unbekannt], 73,0 $[M + H - HCOOH]^+$ und 102,1 amu $[M + H - NH_3]^+$ auf (Abb. 35).

Abb. 35 LC-MS/MS-Spektrum (Produkt-Ionen-Scan) von BMAA (a) und DAB (b) bei $m/z = 119,1$ amu



Im Tune-Modus der Analyst-Software 1.4.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurden die MS/MS-Parameter für die Temperatur der Ionenquelle (T), die

Ionisierungsspannung (IS), das Vernebelungsgas (NEB), das Schutzgas (CUR), das *Collisionally Activated Dissociation Gas* (CAD), das *Declustering Potential* (DP), das *Focussing Potential* (FP), die Kollisionsenergie (CE) und das Kollisionszellen-Austrittspotential (CXP) zur sensitiven Detektion von BMAA (Abb. 36) und DAB (Abb. 37) quantitativ optimiert. Zur gemeinsamen Bestimmung der neurotoxischen Aminosäuren wurden jedoch die optimalen Parameter für BMAA angewendet, da der Nachweis von DAB weitaus empfindlicher war.

Abb. 36 Optimierung der MS/MS-Parameter für die Detektion von BMAA bei $m/z = 119,1 > 102,0$ amu

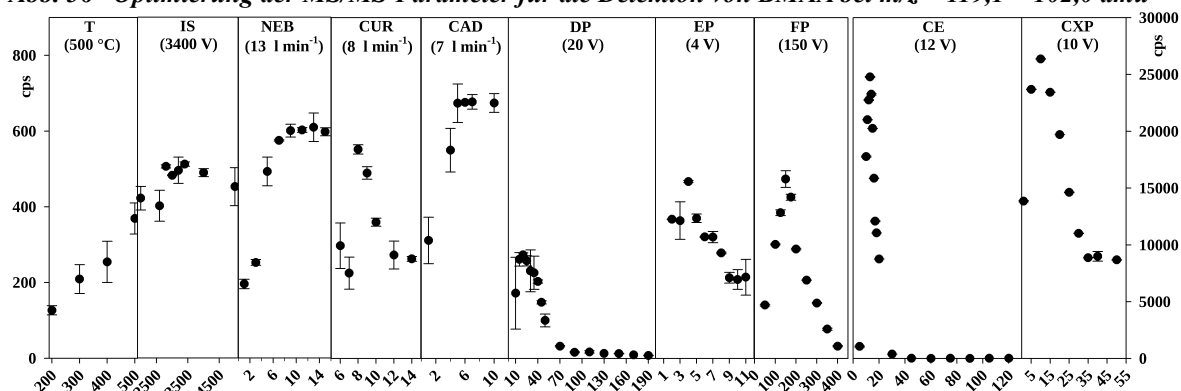
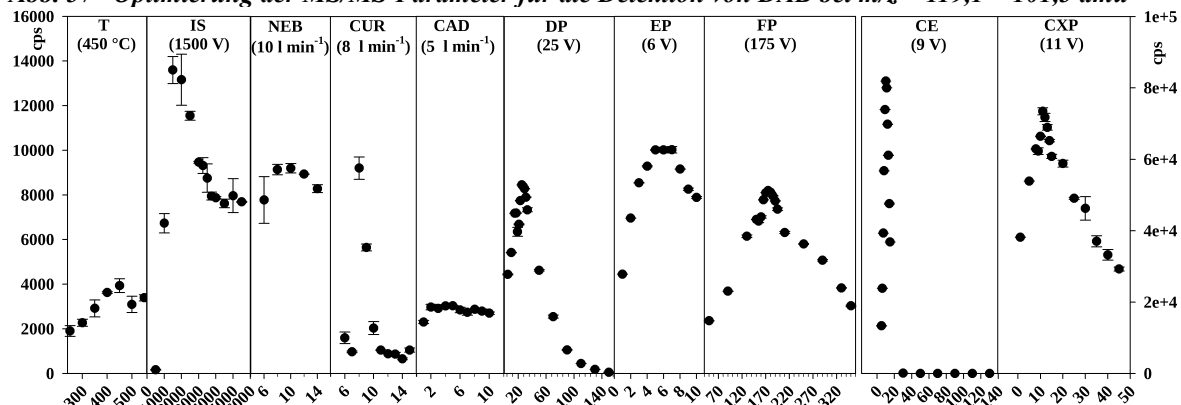


Abb. 37 Optimierung der MS/MS-Parameter für die Detektion von DAB bei $m/z = 119,1 > 101,3$ amu



5.2.3 Nachweisempfindlichkeit und Validierung der Methode

Die Nachweisgrenze ($S/N = 3/1$) der Methode liegt für BMAA bei $1 \mu\text{g g}^{-1}$ in der cyanobakteriellen Matrix und bei $0,14 \mu\text{g g}^{-1}$ in Angiospermensamen. Der Nachweis von DAB war wesentlich sensitiver, denn die Nachweisgrenze betrug $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ für Cyanobakterien und $0,008 \mu\text{g g}^{-1}$ für Angiospermensamen. Die ermittelte Nachweisgrenze für BMAA war vergleichbar mit jener der Methode von Rosén & Hellenäs (2008), jedoch nutzten diese Autoren ein wesentlich empfindlicheres Tandemmassenspektrometer der neueren Generation (API 4000, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), mit dem, im Vergleich zum API 365, eine 10-fach höhere Nachweisempfindlichkeit zu erwarten ist.

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate im Rahmen der Probenaufbereitung verdeutlichte die Leistungsfähigkeit der Methode. Obwohl vor allem hohe Konzentrationen der Analyten mit stärkeren Verlusten einhergehen, beeinflusst jedoch kaum den Nachweis geringer Konzentrationen an BMAA und DAB (Tab. 12). Allgemein sind Matrixeffekte vor allem bei Proteinhydrolysaten zu erwarten. Die Methode zur Extraktion der freien und proteingebundenen Aminosäuren wurde nach Rosén & Hellenäs (2008) durchgeführt, die Wiederfindungsraten von 100 % angeben. Einschränkend muss dabei aber berücksichtigt werden, dass nach Zugabe einer Standardsubstanz keine Aussagen über die Effizienz der Freisetzung des Analyten nach einer Hydrolyse getroffen werden können.

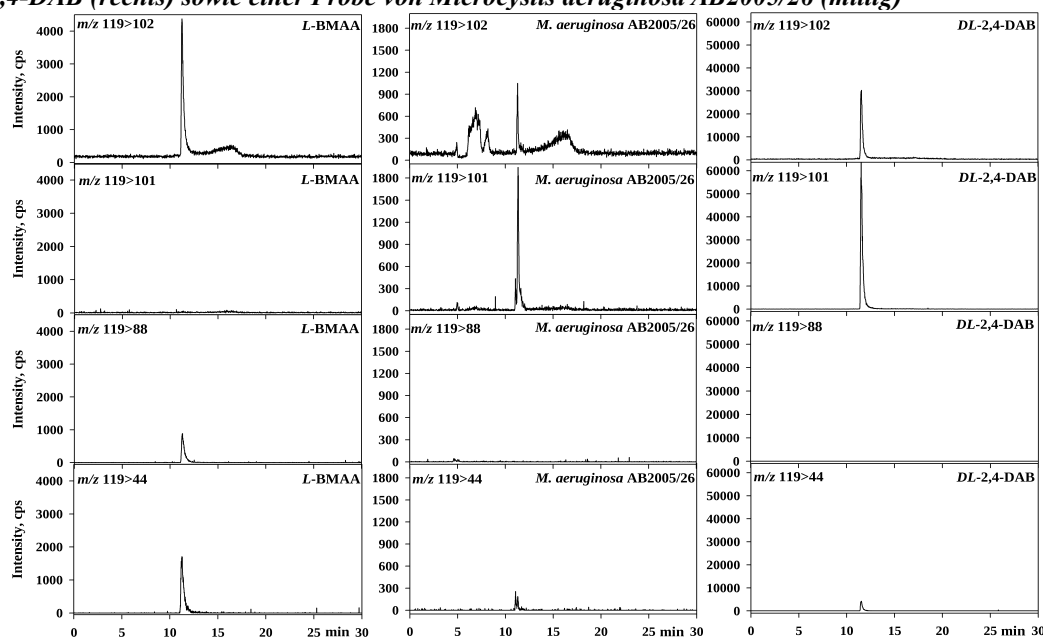
Tab. 12 Durchschnittliche Wiederfindungsrate von BMAA und DAB nach Extraktion und Hydrolyse

Probenaufbereitung	Neurotoxinzusatz (ng)	n	Durchschnittliche		Durchschnittliche	
			Wiederfindung BMAA (ng)	Wiederfindungsrate BMAA (%)	Wiederfindung DAB (ng)	Wiederfindungsrate DAB (%)
Extraktion (freie AS)	1000	3	940 ± 46	94.0 ± 4.6	934 ± 51	93.4 ± 5.1
	2500	3	2199 ± 118	88.0 ± 4.7	2303 ± 54	92.1 ± 2.2
	5000	3	3995 ± 147	79.9 ± 2.9	4511 ± 112	90.2 ± 2.2
Hydrolyse (proteingebundene AS)	1000	3	882 ± 68	88.2 ± 6.8	985 ± 57	98.5 ± 5.7
	2500	3	1946 ± 97	77.8 ± 3.9	2040 ± 143	81.6 ± 5.7
	5000	3	3555 ± 167	71.1 ± 3.7	3896 ± 233	77.9 ± 4.7

5.2.4 Vorkommen von BMAA und DAB in ausgewählten Cyanobakterien

Die Anwendung der hochspezifischen Methode zur Analyse von 30 freilebenden Cyanobakterien und 32 Nahrungsergänzungsmitteln auf der Basis von *Spirulina* und *Aphanizomenon flos-aquae* erbrachte keinen Nachweis für das Vorkommen von BMAA in freier und proteingebundener Form, während DAB bei m/z 119,1 > 101,3 amu in 16 Proben bei Konzentrationen von 0,07-0,83 $\mu\text{g g}^{-1}$ detektiert werden konnte.

Abb. 38 LC-MS/MS-Chromatogramm der Standardlösungen (50 ng/Injektion) von L-BMAA (links) und DL-2,4-DAB (rechts) sowie einer Probe von Microcystis aeruginosa AB2005/26 (mittig)



Tab. 13 Gesamtgehalte an freiem und proteingebundenem BMAA und DAB in freilebenden Cyanobakterien und ausgewählten Pflanzensamen

Cyanobakterien	Herkunft	weitere Toxine	BMAA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DAB ($\mu\text{g g}^{-1}$)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> ITEP18	Brasilien	PSP-Toxine	n.d.	0,37
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Australien	Cylindrospermopsin	n.d.	n.d.
<i>Anabaena oumiana</i> ITEP26	Brasilien	Anatoxin-a(s)	n.d.	n.d.
<i>Anabaena flos-aquae</i> SAG30.87	Kanada	Anatoxin-a	n.d.	0,09*
<i>Microcystis aeruginosa</i> bloom 08/06	Deutschland	Microcystine	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> bloom 09/05	Deutschland	Microcystine	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> Terramare	Deutschland	-	n.d.	0,38
<i>Microcystis aeruginosa</i> SAG B46.80	Deutschland	Microcystine	n.d.	n.d.
<i>Nodularia spumigena</i> Huebel 1988/306	Deutschland	Nodularin	n.d.	0,29
<i>Nodularia harveyana</i> Huebel 1983/300	Deutschland	-	n.d.	0,07*
<i>Nodularia spumigena</i> NSGG01	Polen, Golf von Danzig	Nodularin	n.d.	n.d.
<i>Nodularia spumigena</i> NSGG0205	Polen, Golf von Danzig	Nodularin	n.d.	0,09*
<i>Nodularia spumigena</i> Wilhelmshaven	Deutschland	Nodularin	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/17	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/19	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/22	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/26	China, Lake Chao	-	n.d.	0,56
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/28	China, Lake Chao	-	n.d.	0,15*
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/30	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	0,57
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/31	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	0,07*
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/32	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	0,14*
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/33	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	0,48
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/40	China, Lake Chao	-	n.d.	0,66
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/41	China, Lake Chao	-	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/42	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/43	China, Lake Chao	-	n.d.	n.d.
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/45	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	0,83
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/46	China, Lake Chao	-	n.d.	0,70
<i>Microcystis aeruginosa</i> AB2005/47	China, Lake Chao	Microcystine	n.d.	n.d.
<i>Synechocystis</i> sp.	Südafrika	-	n.d.	n.d.
<i>Cycas revoluta</i> (Samen) Positivkontrolle	Asien	-	6,96**	0,037**
<i>Lathyrus latifolius</i> (Samen) Positivkontrolle	Deutschland	ODAP	n.d.	4,21**

* nur bei $m/z = 119 > 101,3$ detektiert; ** nur freie Aminosäuren wurden analysiert

Tab. 14 Gesamtgehalte an freiem und proteingebundenem BMAA und DAB in Nahrungsergänzungsmitteln auf Basis von Cyanobakterien und anderen Mikroalgen

Routineprobe	Cyanobakterien	Darreichungsform	BMAA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DAB ($\mu\text{g g}^{-1}$)
09 0203	unbekannt	Presslinge	n.d.	n.d.
22 0303	unbekannt	Pulver	n.d.	n.d.
13 0204	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
21 0404	Spirulina	Pulver	n.d.	n.d.
12 0405	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
16 0505-1	Spirulina	Pulver	n.d.	n.d.
16 0505-2	Spirulina	Pulver	n.d.	n.d.
30 0706	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
57 1006-1	Spirulina	Presslinge	n.d.	n.d.
57 1006-2	Spirulina	Presslinge	n.d.	n.d.
36 0807	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
38 0807-1	Spirulina	Presslinge	n.d.	n.d.
38 0807-3	AFA + Spirulina	Kapseln	n.d.	n.d.
38 0807-4	AFA	Kapseln	n.d.	0,08*
41 0907-A	Spirulina	Presslinge	n.d.	n.d.
41 0907-B	Spirulina	Presslinge	n.d.	n.d.
06 0108	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
08 0208	Spirulina	Presslinge	n.d.	n.d.
09 0208-1	unbekannt	Kapseln	n.d.	n.d.
09 0208-2	unbekannt	Presslinge	n.d.	n.d.
16 0308	AFA	Pulver	n.d.	n.d.
19 0308	unbekannt	Presslinge	n.d.	n.d.
20 0308	Spirulina	Pulver	n.d.	n.d.
21 0408	unbekannt	Kapseln	n.d.	n.d.
42 1108	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
43 1108-2	Spirulina	Pulver	n.d.	n.d.
43 1108-3	Spirulina	Presslinge	n.d.	n.d.
44 1108	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
46 1208-1	AFA + Spirulina	Kapseln	n.d.	n.d.
46 1208-2	Spirulina	Presslinge	n.d.	n.d.
46 1208-4	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
05 0509	Spirulina	Chips	n.d.	n.d.
06 0509	AFA	Presslinge	n.d.	n.d.
35 0808	Chlorella (Grünalge)	Presslinge	n.d.	n.d.

* nur bei $m/z = 119 > 101,3$ detektiert

5.2.5 Kontrovers diskutierte Analysenergebnisse bezüglich des Vorkommens von BMAA und DAB in Cyanobakterien im Kontext einer methodologischen Kritik

Für das in Südafrika isolierte Cyanobakterium *Synechocystis* wurden Konzentrationen von $0,23 \mu\text{g g}^{-1}$ an freiem und $5,17 \mu\text{g g}^{-1}$ an proteingebundenem BMAA postuliert (Esterhuizen & Downing 2008). Der Autor dieser Arbeit konnte jedoch auch nach umfangreichen Analysen weder BMAA noch DAB in *Synechocystis* (auch nicht in deutlich niedrigeren Konzentrationen) nachweisen, wobei durchaus in Betracht gezogen wurde, dass die Konzentrationen der Aminosäuren infolge abweichender Wachstumsphasen und Kultivierungsbedingungen stark variieren können. Gleichwohl implizieren solche gegensätzlichen Ergebnisse berechnete Fragen bezüglich der analytischen Methodologie. Esterhuizen & Downing (2008) nutzten den EZ:faastTM-Kit (Phenomenex, Torrance, CA, USA) zur GC-MS-Bestimmung von derivatisiertem BMAA bei m/z 130 amu. Keine Berücksichtigung fand der Umstand, dass andere Aminosäuren, z.B. Alanin, Sarkosin und Tryptophan, unter Anwendung der GC-MS nach Derivatisierung mit dem kommerziell erhältlichen Aminosäurenanalysekit ein dominantes Fragment-Ion mit dem gleichen m/z -Wert von 130 amu aufweisen (Kaspar et al. 2008). Sarkosin kann in freilebenden und symbiotischen Cyanobakterien vorkommen (Hällbom 1984). Außerdem lässt die Anwendung des Kits in Kombination mit der LC-MS keine selektive Detektion von BMAA, DAB und Tryptophan zu, die sämtlich bei m/z 333 $[\text{M}+\text{H}]^+$ detektiert werden. Indes ist die Stabilität von Tryptophan unter saurer Hydrolyse gering (Onslow 1921). Da in der vorliegenden Arbeit aber weder BMAA noch DAB in *Synechocystis sp.* nachweisbar waren, kann hinsichtlich der Ergebnisse von Esterhuizen und Downing (2008) auch nicht von einer Verwechslung der beiden neurotoxischen Isomere ausgegangen werden.

Im Rahmen der Kontrolle von Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis wurden im Mai 2005 *Spirulina*-Proben mit den Laborcodes 16 0505-1 und 16 0505-2 mittels LC-MS nach Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl) nach einem Protokoll von Kirschbaum et al. (1994) positiv auf das Vorkommen von BMAA getestet. Damals wurden $57,9$ bzw. $26,3 \mu\text{g BMAA je g}$ bei m/z 341,3 amu $[\text{119,2}+\text{FMOC}+\text{H}]^+$ auf der Basis der Retentionszeit von 28,6 min detektiert (Tab. 7 & 8). Im Hinblick auf die inzwischen kontrovers geführte Diskussion bezüglich des Vorkommens von BMAA in Cyanobakterien wurden die beiden Proben mit der hochselektiven derivatisierungsfreien LC-MS/MS-Methode erneut analysiert (die trockenen Rückstellproben wurden 4 Jahre bei -20°C gelagert). Auch in diesem Fall waren nun weder BMAA noch DAB nachweisbar (Tab. 14), sodass damals eine Fehlidentifikation von BMAA erfolgte und eine eventuelle

Verwechslung der beiden Isomere ebenfalls auszuschließen ist.

Weitere Studien, die das ubiquitäre Vorkommen von BMAA in Cyanobakterien postulieren (Cox et al. 2005, Banack et al. 2007, Johnson et al. 2008, Metcalf et al. 2008), nutzten für den Nachweis von BMAA ausschließlich die Derivatisierung primärer und sekundärer Amine mit AQC, jedoch können damit in Cyanobakterien nach saurer Hydrolyse weit mehr als 50 Komponenten detektiert werden, die chromatografisch meistens nicht vollständig getrennt werden. Aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit wurde (AQC)₂BMAA in den betreffenden Studien stets mittels Fluoreszenzdetektion bestimmt, auch wenn eine qualitative Absicherung durch LC-MS-Messungen erfolgte. Unabhängig davon müssen HPLC-FLD-Bestimmungen von BMAA als Derivat durchaus als Ursache für Fehlinterpretationen oder Überschätzungen des Vorkommens von BMAA in Cyanobakterien in die Betrachtungen einbezogen werden. Im Zuge der MS/MS-Absicherung von (AQC)₂BMAA wurden die dominanten Produkt-Ionen m/z 289 [M+AQC+H]⁺, 171 [AQC]⁺ und 119 amu [M+H]⁺ des Precursor-Ions m/z 459 amu [M+2AQC+H]⁺ herangezogen (Banack et al. 2007), die aber eine Unterscheidung von BMAA und DAB nicht zulassen. Demgegenüber empfehlen Rosén & Hellenäs (2008) die eindeutige Bestimmung auf der Basis spezifischer Fragmente für BMAA (m/z 258, 88, 76 amu) und DAB (m/z 269, 188, 101 amu). Die Derivatisierung mit Reagenzien wie AQC bewirkt eine systematische Egalisierung der Molekülstruktur sowie der physikalisch-chemischen Charakteristika, wodurch die chromatografische Trennung erschwert wird. Dabei ist für eine eindeutige Bestimmung von BMAA und DAB die vollständige chromatografische Trennung gefolgt von einer spezifischen Detektion der Neurotoxine erforderlich. In diesem Zusammenhang wurde die Möglichkeit diskutiert, dass eine andere Komponente mit AQC zu einem BMAA-Derivat reagieren könnte, z.B. ein Carbamat des BMAs (Myers & Nelson 1990), insbesondere α -N-Carboxy-BMAA wird unter Ansäuerung rasch zu BMAA umgewandelt (Nunn & O'Brien 1989), oder Glucuronide der Carbamate (Schaefer 2006). Gleichmaßen steht auch das genuine Vorkommen von DAB in Cyanobakterien zur Debatte, da die Bildung von DAB aus Glutaminresten nach alkalischer Hydrolyse von Proteinen nachgewiesen wurde (Synge 1939). In diesem Kontext erlangt die Probenaufbereitung besondere Bedeutung, vor allem im Hinblick auf mögliche Stoffumwandlungsprozesse. Indes konnte nach saurer Hydrolyse einer mit 100 µg freiem Glutamin versetzten cyanobakteriellen Probe keine Bildung von DAB nachgewiesen werden.

Ähnlich wie das Vorkommen von BMAA könnte auch das ubiquitäre Vorkommen von DAB in Cyanobakterien weitreichende toxikologische Implikationen für die Nahrungsmittel- und Umweltsicherheit haben, denn die weltweite Verbreitung von Cyanobakterien lässt eine umfassende Exposition durch Trinkwasser (insbesondere Oberflächenwasser) oder Produkte auf cyanobakterieller Basis vermuten. Auch müsste dann das Vorkommen dieser Neurotoxine in aquatischen Organismen oder symbiotischen Pflanzen mit nutritiver Bedeutung für den Menschen eruiert werden. Indes bleibt eine toxikologische Relevanz von BMAA und DAB derzeit fraglich, zumal das Vorkommen von BMAA in Cyanobakterien bisher nicht mittels einer eindeutigen hochspezifischen Detektion der underivatisierten Aminosäure bestätigt werden konnte und die eindeutig nachgewiesenen Gehalte an DAB $1 \mu\text{g g}^{-1}$ nicht übersteigen. Somit scheint gegenwärtig in Nahrungsergänzungsmitteln auf cyanobakterieller Basis die Problematik des Vorkommens von Microcystinen von weitaus größerer toxikologischer Bedeutung zu sein.

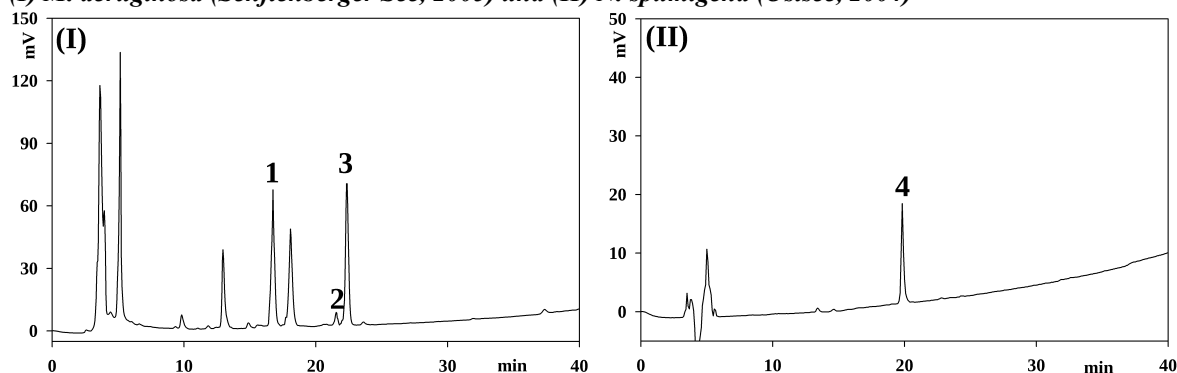
5.3 Vorkommen und Nachweis desmethylierter cyanobakterieller Peptidtoxine

5.3.1 Bestimmung desmethylierter Peptidtoxine mittels HPLC-UV nach ISO 20179

Phytoplankton einer „Algenblüte“ aus dem Senftenberger See (2005) mit dem dominanten Vorkommen von *M. aeruginosa* wurde unter Anwendung der HPLC-UV-Methode nach der Norm ISO 20179 untersucht. Auf der Basis der Retentionszeiten der MC-Standards wurden $1290 \mu\text{g g}^{-1}$ MC-LR, $1406 \mu\text{g g}^{-1}$ MC-RR und $56 \mu\text{g g}^{-1}$ MC-YR detektiert. Der Einsatz der Kopplung LC-MS zur Absicherung der Ergebnisse ergab jedoch erheblich geringere Konzentrationen von $138,5 \mu\text{g g}^{-1}$ MC-LR, $7,8 \mu\text{g g}^{-1}$ MC-RR und $14,6 \mu\text{g g}^{-1}$ MC-YR. Ein Precursorscan des charakteristischen Adda-Fragments bei m/z 135 amu mittels LC-MS/MS deutete auf das dominante Vorkommen desmethylierter Strukturvarianten ($[\text{M}+\text{H}-14]^+$ und $[\text{M}+2\text{H}-7]^{2+}$) hin. Die HPLC-UV-Methode nach ISO 20179 ermöglicht aufgrund von Koelutionen der rechtlich relevanten MCs mit ihren desmethylierten Varianten keine eindeutige Differenzierung auf Basis der Retentionszeiten. Außerdem ermöglicht die Methode nach ISO 20179, der die Methode nach Lawton et al. (1994) zugrunde liegt, keine chromatografische Trennung von Nodularin und Desmethyl-NODs (Abb. 39). Toxikologische Unterschiede der desmethylierten Varianten könnten unter Anwendung des standardisierten Analyseverfahrens Unsicherheiten bezüglich einer adäquaten Risikobewertung toxischer „Algenblüten“ heraufbeschwören. Daher bedurfte es der Entwicklung einer

leistungsfähigeren chromatografischen Trennmethode unter Beibehaltung der UV-Detektion. Durch den Einsatz eines MS-gängigen Puffers in der mobilen Phase und einer stationären Phase mit geringem „Säulenbluten“ sollte ferner die Übertragbarkeit der Methode auf hochspezifische massenselektive Detektionsverfahren gewährleistet werden.

Abb. 39 HPLC-UV Bestimmung nach Lawton et al. 1994 (ISO 20179) von MC-RR / dm-MC-RR (1), MC-YR / dm-MC-YR (2), MC-LR / dm-MC-LR (3) und NOD / dm-NOD (4) in Rohextrakten von (I) *M. aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) und (II) *N. spumigena* (Ostsee, 2004)



5.3.2 Chromatografische Trennung desmethylierter Peptidtoxine

Aufgrund der geringen Selektivität gewöhnlicher Alkylphasen (C8, C18) bezüglich der eindeutigen Identifikation von MCs und dm-MCs auf Basis der Retentionszeiten wurden in der Vergangenheit zahlreiche stationäre Phasen getestet. Meriluoto et al. (1990) gelang die Trennung zweier dm-MC-RR-Varianten vom MC-RR mit einer *internal-surface reversed-phase* GFF-Säule (Gly-Phe-Phe) unter Anwendung einer sauren mobilen Phase (1 M Phosphatpuffer, pH 2; 10 % Tetrahydrofuran). Baldia et al. (2003) trennte 3-dm-MC-LR von MC-LR unter Einsatz eines Phosphat-Puffers und einer *Cosmosil*-Säule (Silica-gebundene Cholesteryl-Gruppe). Beide Methoden sind aber aufgrund der Verwendung eines Phosphat-Puffers nicht für die massenspektrometrische Detektion geeignet. Basierend auf einer stationären Amid-C16-Phase entwickelten Spoof et al. (2001) ein MS-gängiges HPLC-Verfahren zur Trennung von dm-MCs und MCs. Trotz hoher Selektivität erfolgt bei dieser Methode eine Koelution von dm-MC-LR und MC-YR.

Eine erfolgreiche Trennung des Nodularins von zwei Varianten von Desmethyl-NODs (Abb. 40) sowie der Microcystine-LR, -RR und -YR von ihren einfach und doppelt desmethylierten Strukturvarianten (Abb. 41) gelang in der vorliegenden Arbeit auf Basis stationärer perfluorierter Phenylphasen (Pentafluorphenyl- und Pentafluorphenylpropyl-Phasen). Der Einsatz eines Formiat-Puffers ermöglichte ferner die massenspektrometrische Absicherung der Methode. Die Verwendung unterschiedlicher HPLC-Anlagen für die UV- und MS-Detektion verursachte jedoch erhebliche Unterschiede in den Retentionszeiten der

einzelnen MCs (Abb. 40). Die HPLC-Säulen Varian Monochrom MS und Phenomenex Luna PFP(2) zeigten eine vergleichbare Selektivität. Die beiden unterschiedlichen HPLC-Säulen wurden im Rahmen der semipreparativen Isolation der einzelnen MC- und NOD-Fractionen auf ihre Stabilität und Reproduzierbarkeit getestet. Während die HPLC-Säule Monochrom MS nach intensiver Nutzung Retentionszeitverschiebungen und Selektivitätseinbußen aufwies, zeigte die HPLC-Säule Luna PFP (2) auch nach mehr als 100 chromatografischen Läufen eine überragende Stabilität, d. h. stabile Retentionszeiten.

Abb. 40 (I) Chromatografische Trennung und Detektion von dm-NOD ($t_{R2} = 10,7$ min) und NOD ($t_{R3} = 11,6$ min) eines *Nodularia spumigena* - Rohextraktes mittels HPLC-UV ($\lambda = 238$ nm). (II) HPLC-UV-Bestimmung von dm-NOD ($t_{R2} = 10,6$ min) und NOD ($t_{R3} = 11,5$ min) nach 100 weiteren chromatografischen Läufen (je 30 μ l Injektionsvolumen) (III) LC-MS-Bestimmung von dm-NODs ($t_{R1} = 11,29$ min, $t_{R2} = 11,94$ min) und NOD ($t_{R3} = 12,98$ min) im SIM-Modus bei m/z 811,5 und 825,5 amu). (I-III) Anwendung der HPLC-Säule Phenomenex Luna PFP (2) (250 x 4,6 mm, 5 μ m) bei isokratischer Elution (5 mM Ammoniumformat, 53 mM Ameisensäure in 73 % H_2O / 27 % ACN, 1,0 ml min⁻¹)

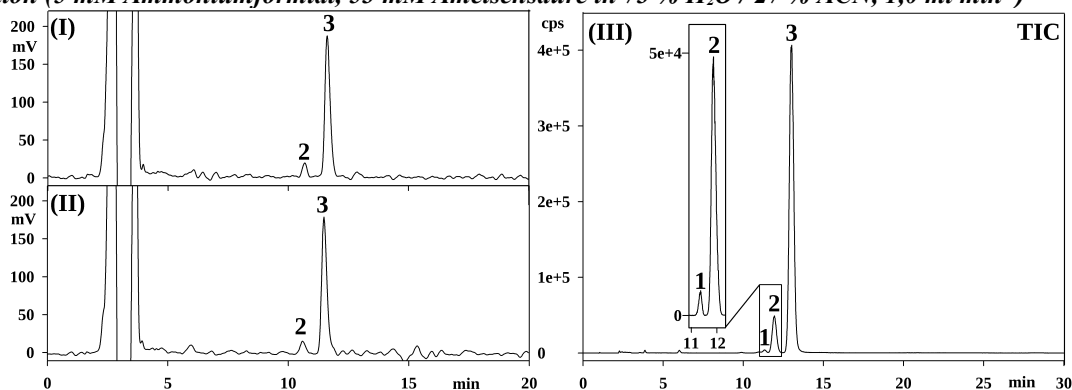
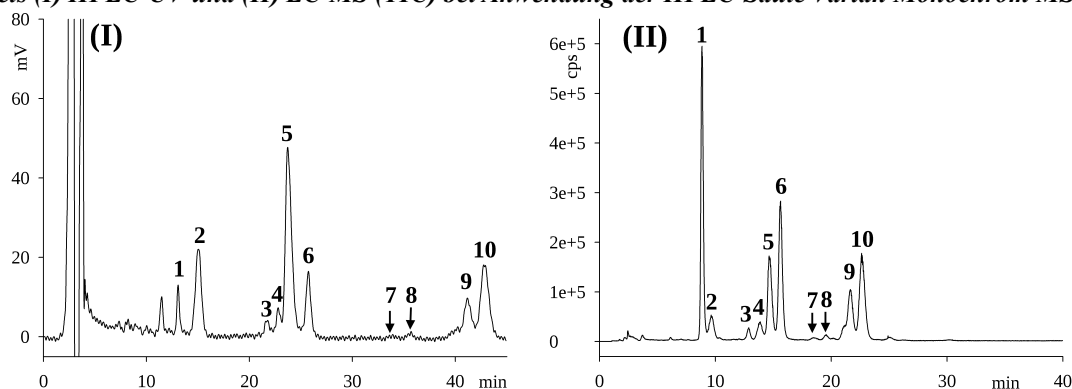


Abb. 41 Chromatografische Trennung von dmdm-MC-LR (1), dmdm-MC-YR (2), dmdm-MC-RR (3), MC-RR (4), dm-MC-RR (5), NOD (6), MC-YR (7), dm-MC-YR (8), MC-LR (9) und dm-MC-LR (10) eines Rohextrakts von *M. aeruginosa* aus dem Senftenberger See (2005) unter Zugabe eines NOD-Standards mittels (I) HPLC-UV und (II) LC-MS (TIC) bei Anwendung der HPLC-Säule Varian Monochrom MS

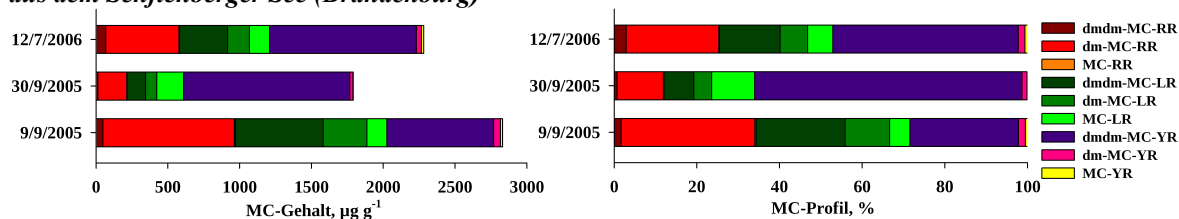


Unabhängig davon ist die Bestimmung der exakten chemischen Struktur der desmethylierten Peptidtoxine eine unverzichtbare Bedingung für eine adäquate Risikobewertung unter Berücksichtigung toxikologischer Unterschiede. Die Isolierung der einzelnen MC-Varianten von *M. aeruginosa* aus dem Senftenberger See (2005 und 2006) durch semipräparative HPLC bildete die Grundlage für die nachfolgenden Analysen im Hinblick auf die exakte chemische Struktur der einzelnen Microcystine.

5.3.3 Vorkommen und toxikologische Relevanz von desmethylierten Peptidtoxinen

Die LC-MS-Analysen von Phytoplanktonproben globaler Provenienz auf MCs verdeutlichten das ubiquitäre Vorkommen von Desmethyl-Varianten der zyklischen Peptidtoxine. Zumeist kommen diese im Vergleich zu den methylierten Strukturvarianten in geringeren Konzentrationen vor. Die Phytoplanktonproben aus dem Senftenberger See der Jahre 2005 und 2006 zeigten indes, dass dm-MCs bisweilen als dominante MC-Fraktionen vorkommen können (Abb. 42, Tab 15).

Abb. 42 Absolute und relative quantitative Verteilung der Microcystine in Phytoplankton (*M. aeruginosa*) aus dem Senftenberger See (Brandenburg)



Tab. 15 LC-MS-Bestimmung der Microcystingehalte unterschiedlicher Phytoplanktonproben in $\mu\text{g g}^{-1}$ Trockenmasse bzw. $\mu\text{g l}^{-1}$ Wasser *

Probe	Herkunft	dmdm-MC-RR	dm-MC-RR	MC-RR	dmdm-MC-LR	dm-MC-LR	MC-LR	dmdm-MC-YR	dm-MC-YR	MC-YR	dm-MC-LA	MC-LA	MC-LF	MC-LW	Gesamt-MCs
<i>M. aerug.</i> AB2005/17	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	156,0	25,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,06	1,83	410,5
<i>M. aerug.</i> AB2005/19	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	131,7	2417,5	n.d.	120,0	2129,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4799,1
<i>M. aerug.</i> AB2005/22	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,3	n.d.	n.d.	1,7	n.d.	0,6	n.d.	n.d.	4,5
<i>M. aerug.</i> AB2005/26	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. aerug.</i> AB2005/28	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. aerug.</i> AB2005/30	Lake Chaohu, China	n.d.	113,1	678,8	3,5	142,8	866,5	n.d.	1,8	9,0	23,3	175,1	2,2	1,5	2017,6
<i>M. aerug.</i> AB2005/31	Lake Chaohu, China	n.d.	94,5	778,1	1,4	108,7	824,8	n.d.	1,2	8,9	20,7	204,5	2,0	1,8	2046,7
<i>M. aerug.</i> AB2005/32	Lake Chaohu, China	2,8	205,2	2179,2	n.d.	224,8	1387,8	n.d.	1,7	13,6	14,2	136,3	2,3	2,3	4170,1
<i>M. aerug.</i> AB2005/33	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	62,4	n.d.	1,7	44,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	3,4	2,2	115,1
<i>M. aerug.</i> AB2005/40	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. aerug.</i> AB2005/41	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. aerug.</i> AB2005/42	Lake Chaohu, China	n.d.	1,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,9
<i>M. aerug.</i> AB2005/43	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. aerug.</i> AB2005/45	Lake Chaohu, China	1,4	17,1	276,5	n.d.	10,6	99,7	n.d.	n.d.	4,4	n.d.	n.d.	81,6	112,4	603,6
<i>M. aerug.</i> AB2005/46	Lake Chaohu, China	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. aerug.</i> AB2005/47	Lake Chaohu, China	1,5	292,4	1944,9	1,0	103,2	656,5	n.d.	4,1	49,1	14,5	84,7	0,7	n.d.	3152,6
<i>M. aerug.</i> 09.09.2005	Senftenberger See, Dt.	47,9	915,2	7,8	611,3	303,7	138,5	743,8	47,6	14,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2830,4
<i>M. aerug.</i> 30.09.2005	Senftenberger See, Dt.	12,9	200,5	2,3	129,5	77,1	186,4	1157,7	21,8	2,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1790,8
<i>M. aerug.</i> 12.07.2006	Senftenberger See, Dt.	66,6	510,6	2,8	335,7	152,48	139,0	1023,3	36,3	14,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2281,5
<i>Microcystis</i> 09/2008	Bautzener Stausee, Dt.	1,8	17,1	464,4	829,5	11,36	68,4	11,21	8,6	75,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1488,3
<i>Anabaena</i> 27.08.2007	Maschener Moor, Dt.	n.d.	3,4*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,4*
„Green Ovoid“ E1	Mandalay, Myanmar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Microcystis</i> sp. E2	Mandalay, Myanmar	n.d.	n.d.	0,48*	n.d.	n.d.	0,02*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,5*
<i>Ana.</i> , <i>Microcystis</i> W2	Mandalay, Myanmar	1,4*	32,0*	349,9*	n.d.	8,5	121,5*	n.d.	n.d.	15,0*	n.d.	5,5*	0,03*	n.d.	533,8*
<i>Cylindrops.</i> sp. MM-2	Mandalay, Myanmar	n.d.	n.d.	0,05*	n.d.	n.d.	0,03*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,08*
<i>Anabaena</i> sp. MM-7	Mandalay, Myanmar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06*	n.d.	0,06*
<i>Oscillatoria</i> sp. MM-12	Mandalay, Myanmar	n.d.	n.d.	0,24*	n.d.	n.d.	0,09*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,33*
<i>Euglena</i> sp. MM-20	Mandalay, Myanmar	n.d.	n.d.	0,06*	n.d.	n.d.	0,02*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,08*
<i>Oscillatoria</i> sp. MM-31	Mandalay, Myanmar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Euglena</i> sp. MM-67	Mandalay, Myanmar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ana.</i> sp. 14.04.2008	Bangladesh	n.d.	n.d.	n.d.	2,0*	1,3*	0,7*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,0*
ER3 2007	Brasilien	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3
10.10.2007	Santa Cruz, Brasilien	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,0
TAQUA 2007.1	São Paulo, Brasilien	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,8	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,4
ARG 18.09.2006	Brasilien	n.d.	n.d.	1,9	n.d.	n.d.	1,4	n.d.	n.d.	1,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,8
ARG 12.12.2006	Brasilien	n.d.	n.d.	4,3	n.d.	n.d.	4,2	n.d.	n.d.	2,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,7
01.09.2006	Itajá, Brasilien	n.d.	n.d.	2,6	n.d.	n.d.	1,0	n.d.	n.d.	1,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,8
19.10.2006	Itajá, Brasilien	n.d.	n.d.	1,7	n.d.	n.d.	1,6	n.d.	n.d.	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,3
LTPNA 01	São Paulo, Brasilien	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LTPNA 02	São Paulo, Brasilien	n.d.	11,8	680,5	n.d.	13,1	224,7	n.d.	n.d.	46,6	n.d.	n.d.	13,4	10,6	1000,7
LTPNA 02CC	São Paulo, Brasilien	n.d.	16,3	599,5	n.d.	15,2	232,7	n.d.	n.d.	58,2	n.d.	n.d.	18,6	20,0	960,5
LTPNA 03	São Paulo, Brasilien	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LTPNA 06	São Paulo, Brasilien	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LTPNA 08	São Paulo, Brasilien	n.d.	5,7	276,7	n.d.	7,5	67,8	n.d.	n.d.	24,6	n.d.	n.d.	8,0	32,2	422,5
LTPNA 09	São Paulo, Brasilien	n.d.	12,6	359,1	n.d.	18,6	134,8	n.d.	n.d.	49,1	n.d.	n.d.	8,1	7,0	589,3
LTPNA 10	São Paulo, Brasilien	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AME I 2006	Americana, Brasilien	n.d.	3,0	203,1	n.d.	1,7	32,8	n.d.	n.d.	13,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	254,3
AME II 2007	Americana, Brasilien	n.d.	2,9	226,8	n.d.	6,4	47,7	n.d.	n.d.	19,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	303,5
FOZ	São Paulo, Brasilien	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TAQUA 2007.2	São Paulo, Brasilien	n.d.	1,3	0,4	n.d.	5,5	3,3	n.d.	n.d.	5,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,1

Dies impliziert gleichsam die Notwendigkeit einer differenzierten Erfassung aller Strukturvarianten als Grundlage einer adäquaten toxikologischen Risikobewertung von

cyanobakteriellen Massenvorkommen in Gewässern. In zahlreichen Studien wurde die Toxizität desmethylierter Microcystine und Nodularine untersucht, wobei nicht zuletzt aufgrund unterschiedlicher Testverfahren keine eindeutige Datenlage erreicht wurde: Blom et al. (2001) fanden eine höhere LC_{50} -Toxizität (mittlere letale Konzentration) von $[Asp^3, (E)\text{-Dhb}^7]MC\text{-}RR$ ($3,6 \mu M$) im Vergleich zu $MC\text{-}RR$ ($8,3 \mu M$), $-LR$ ($8,6 \mu M$) und $-YR$ ($6,1 \mu M$) unter Anwendung des *Thamnocephalus platyurus*-Bioassays. Chen et al. (2006) ermittelten etwas geringere LD_{50} - und IC_{50} -Toxizitäten (Maus) für $[Asp^3]MC\text{-}RR$ ($LD_{50} = 350 \mu g \text{ kg}^{-1}$, $PP1\text{-}IC_{50} = 4,8 \text{ nM}$) und $[Dha^7]MC\text{-}RR$ ($LD_{50} = 420 \mu g \text{ kg}^{-1}$, $PP1\text{-}IC_{50} = 2,2 \text{ nM}$) im Vergleich zu $MC\text{-}RR$ ($LD_{50} = 320 \mu g \text{ kg}^{-1}$, $PP1\text{-}IC_{50} = 1,7 \text{ nM}$). Im Gegensatz dazu demonstrieren frühere Daten, die von Hoeger et al. (2007) und Furey et al. (2008) zusammengefasst wurden, signifikant höhere LD_{50} -Toxizitäten für $[Asp^3]MC\text{-}RR$ ($250 \mu g \text{ kg}^{-1}$), $[Dha^7]MC\text{-}RR$ ($180 \mu g \text{ kg}^{-1}$) und $[Asp^3, (E)\text{-Dhb}^7]MC\text{-}RR$ ($250 \mu g \text{ kg}^{-1}$) im Vergleich zu $MC\text{-}RR$ ($600 \mu g \text{ kg}^{-1}$).

5.3.4 Strukturaufklärung desmethylierter Peptidtoxine

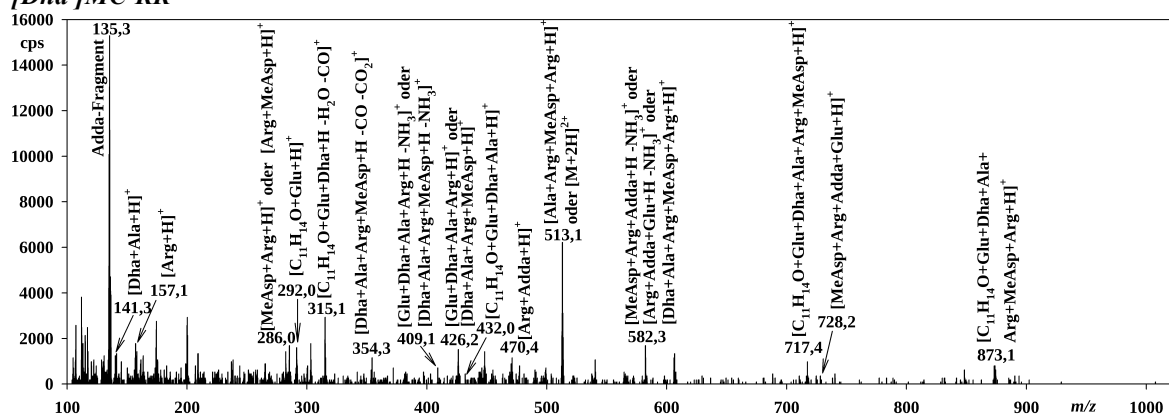
Das dominante Vorkommen von Desmethyl- $MC\text{-}RR$ in *M. aeruginosa* aus dem Senftenberger See (2005) warf die Frage nach der exakten chemischen Struktur des zyklischen Peptidtoxins auf. Für $dm\text{-}MC\text{-}RR$ sind die Strukturvarianten $[Asp^3]MC\text{-}RR$, $[Asp^3, Dhb^7]MC\text{-}RR$, $[Dha^7]MC\text{-}RR$ und $[DMAdda^5]MC\text{-}RR$ möglich. Bei einer Desmethylierung an Position 3 wäre *D*-erythro- β -Methylasparaginsäure (*D*-MeAsp) durch *D*-Asparaginsäure substituiert, dabei kann an Position 7 sowohl *N*-Methyldehydroalanin (*Mdha*) als auch das Isomer Dehydrobutyrin (*Dhb*) vorliegen. Dehydroalanin läge bei einer Desmethylierung an Position 7 vor. Außerdem kann 3-Amino-9-oxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadiensäure (*DMAdda*) an Position 5 anstelle von *Adda* vorkommen.

Das periodische Massenauftreten von *N. spumigena* in der spätsommerlichen Ostsee kann mit hohen Nodularinkonzentrationen einhergehen. Die Analyse von Phytoplanktonproben ergab dabei das Vorkommen von Desmethyl-Nodularin im Verhältnis von 1:5 - 1:20 ($dm\text{-}NOD/NOD$). Für $dm\text{-}NOD$ sind die Strukturvarianten $[Asp^1]NOD$, $[DMAdda^3]NOD$ und $[Dhb^5]NOD$ möglich. Bei einer Desmethylierung an Position 1 wäre *D*-MeAsp durch *D*-Asp substituiert. Ferner kann an Position 3 *DMAdda* anstelle von *Adda* und an Position 5 *Dhb* anstelle von *N*-Methyldehydrobutyrin (*Mdhb*) auftreten. Eine eindeutige Identifikation der chemischen Struktur bildet jedoch die Grundlage für eine exakte toxikologische Bewertung und ist deshalb unbedingt erforderlich.

5.3.4.1 Tandem-Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Desmethylierung am C9-Atom von Adda wurde mittels LC-MS/MS im MRM- und PIS-Modus durchgeführt. Das Vorkommen des charakteristischen Adda-Fragments bei m/z 135,1 amu und die Abwesenheit des DMAdda-Fragments bei m/z 121,1 amu in den Fraktionen von dm-MC-RR, dm-MC-LR und dm-NOD bestätigten, dass die Desmethylierung keinesfalls an Position 5 der Heptapeptide bzw. an Position 3 des Pentapeptids vorliegt (Abb. 43-45). Zur Unterscheidung von MeAsp/Asp an Position 3 und Mdha/Dha/Dhb an Position 7 des Microcystin-Moleküls sind insbesondere jene Fragmente signifikant, die entweder die Aminosäure an Position 3 oder an Position 7 aufweisen. Analog gilt für die Zuordnung von MeAsp/Asp an Position 1 und Mdhb/Dhb an Position 5 des Nodularin-Moleküls die Notwendigkeit der Identifikation von Fragmenten, aufgrund derer die Aminosäure entweder Position 1 oder Position 5 des Pentapeptids zugeordnet werden kann. Der Produkt-Ionen-Scan der dm-MC-RR-Fraktion von *M. aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) deutete auf das Vorkommen von $[Dha^7]MC-RR$ hin. Durch die Fragmente m/z 141 $[Dha+Ala+H]^+$, m/z 286 $[MeAsp+Arg+H]^+ / [Arg+MeAsp+H]^+$, m/z 315 $[C_{11}H_{15}O+Glu+Dha+H - CO - H_2O]^+$, m/z 432 $[C_{11}H_{14}O+Glu+Dha+Ala+H]^+$ und m/z 728 $[MeAsp+Arg+Adda+Glu+H]^+$ konnte die Desmethylierung an Position 7 nachgewiesen werden (Abb. 43).

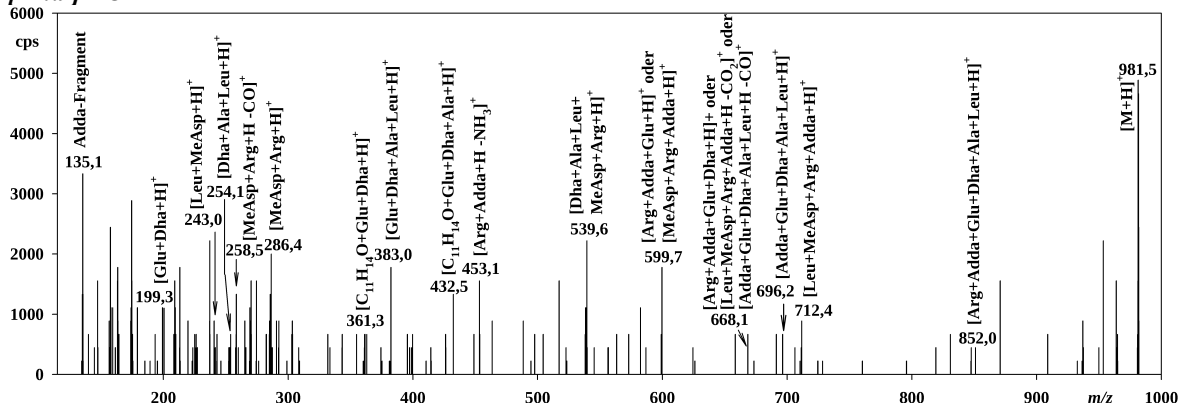
Abb. 43 LC-MS/MS-Produkt-Ionen-Scan ($Q1$ m/z 512,7 > $Q3$ -Scan) der dm-MC-RR-Fraktion von *M. aeruginosa* aus dem Senftenberger See (2005) bei einer Kollisionsenergie von 35 V: Nachweis von $[Dha^7]MC-RR$



Der Produkt-Ionen-Scan der dm-MC-LR-Fraktion von *M. aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) ermöglichte die Identifikation von $[Dha^7]MC-LR$. Durch die Fragmente m/z 199 $[Glu+Dha+H]^+$, m/z 243 $[Leu+MeAsp+H]^+$, m/z 254 $[Dha+Ala+Leu+H]^+$, m/z 258 $[MeAsp+Arg+H - CO]^+$, m/z 286 $[MeAsp+Arg+H]^+$, m/z 361 $[C_{11}H_{14}O+Glu+Dha+H]^+$, m/z 383 $[Glu+Dha+Ala+Leu+H]^+$, m/z 432 $[C_{11}H_{14}O+Glu+Dha+Ala+H]^+$, m/z 668 $[Arg+Adda+Glu+Dha+H]^+ / [Adda+Glu+Dha+Ala+Leu - CO]^+ / [Leu+MeAsp+Arg+Adda+H$

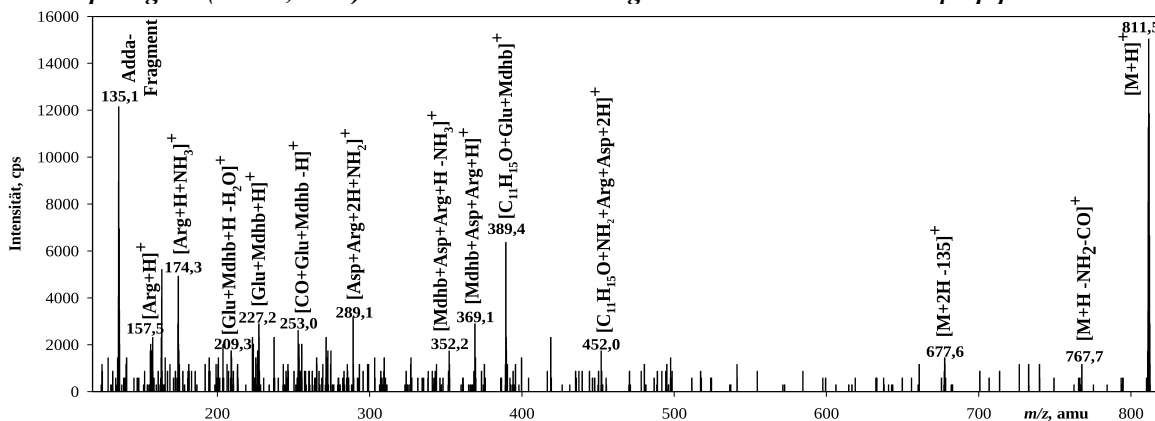
- CO₂)⁺, m/z 696 [Adda+Glu+Dha+Ala+Leu+H]⁺, m/z 712 [Leu+MeAsp+Arg+Adda]⁺ und m/z 852 [M+H - MeAsp]⁺ wurde eindeutig die Desmethylierung an Position 7 nachgewiesen (Abb. 44).

Abb. 44 LC-MS/MS-Produkt-Ionen-Scan ($Q1$ m/z 981 > $Q3$ -Scan) der dm-MC-LR-Fraktion von *M. aeruginosa* aus dem Senftenberger See (2005) bei einer Kollisionsenergie von 60 V: Nachweis von [Dha⁷]MC-LR



Außerdem ermöglichte die LC-MS/MS-Bestimmung der dm-NOD-Fraktion von *N. spumigena* (Ostsee, 2004) im PIS-Modus die Identifikation von [Asp¹]NOD. Die von Marzur-Marzec et al. (2006) für dm-NOD beschriebenen Fragmente m/z 209 [Glu+Mdhb+H - H₂O]⁺, m/z 227 [Glu+Mdhb+H]⁺, m/z 253 [CO+Glu+Mdhb - H]⁺, m/z 289 [Asp+Arg+2H+NH₂]⁺, m/z 389 [C₁₁H₁₅O+Glu+Mdhb]⁺ und m/z 452 [C₁₁H₁₅O+NH₂+Arg+Asp+2H]⁺ weisen eindeutig die Desmethylierung an Position 1 des Pentapeptids nach (Abb. 45).

Abb. 45 LC-MS/MS-Produkt-Ionen-Scan ($Q1$ m/z 811,5 > $Q3$ -Scan) der dominanten dm-NOD-Fraktion von *N. spumigena* (Ostsee, 2004) bei einer Kollisionsenergie von 35 V: Nachweis von [Asp¹]NOD



5.3.4.2 Ionenfallen-Massenspektrometrie

Fragmentierungsmuster der Triple-Quadrupol- und Ionenfallen-Massenanalysatoren können aufgrund der unterschiedlichen Messprinzipien zuweilen differieren. Die Anwendung beider Methoden bietet demnach ein breiteres Spektrum möglicher charakteristischer Fragmente zur eindeutigen Identifikation der exakten chemischen

Struktur zyklischer Peptidtoxine. Indes konnte das charakteristische Adda-Fragment nicht im MS²-Spektrum nachgewiesen werden, da die Massendifferenz des kleinen Fragment-Ions (m/z 135) zu den entsprechenden Molekular-Ionen die dem Messprinzip der Ionenfalle zugrunde liegende kritische Grenze übersteigt. MS²-Spektren der dm-MC-RR-Fraktion von *M. aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) bei m/z 512,7 $[M+2H]^{2+}$ zeigten die diskriminatorischen Fragment-Ionen m/z 226 $[Glu+Dha+Ala+H - CO_2]^+$, m/z 297 $[Dha+Ala+Arg+H]^+$, m/z 315 $[C_{11}H_{15}O+Glu+Dha+H - CO - H_2O]^+$, m/z 426 $[Glu+Dha+Ala+Arg+H]^+$, m/z 521 $[Adda+Glu+Dha+Ala+H - H_2O - CO_2]^+$ und m/z 728 $[MeAsp+Arg+Adda+Glu+H]^+$, die sämtlich auf das Vorkommen von $[Dha^7]MC-RR$ hinweisen (Abb. 46).

Abb. 46 MS²-Spektrum von dm-MC-RR mittels LC-MS-Ionenfalle (Bruker Daltonics Esquire HCT) bei m/z 512,7 $[M+2H]^{2+}$: Nachweis von $[Dha^7]MC-RR$

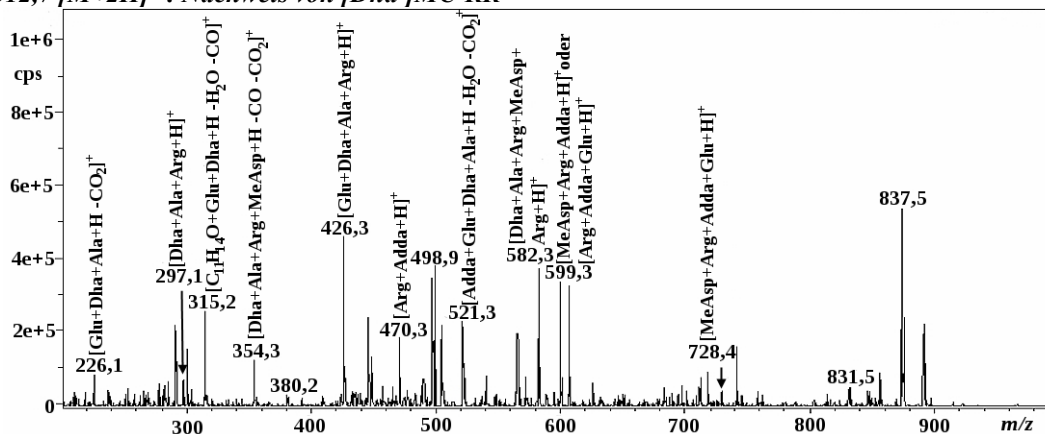
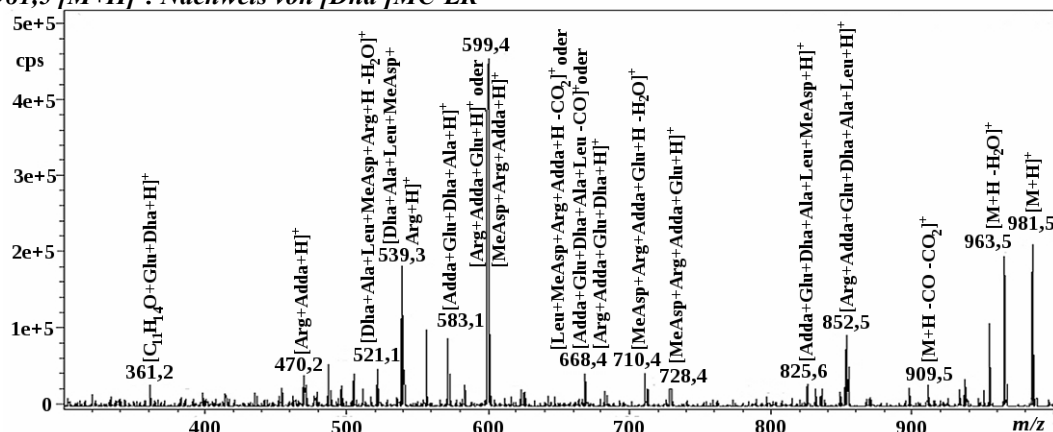


Abb. 47 MS²-Spektrum von dm-MC-LR mittels LC-MS-Ionenfalle (Bruker Daltonics Esquire HCT) bei m/z 981,5 $[M+H]^+$: Nachweis von $[Dha^7]MC-LR$



MS²-Spektren der dm-MC-LR-Fraktion von *M. aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) bei m/z 981,5 $[M+H]^+$ ermöglichten die Identifikation von $[Dha^7]MC-LR$ anhand der spezifischen Fragmente m/z 361 $[C_{11}H_{14}O+Glu+Dha+H]^+$, m/z 583 $[Adda+Glu+Dha+Ala+H]^+$, m/z 668 $[Arg+Adda+Glu+Dha+H]^+$ / $[Adda+Glu+Dha+Ala+Leu - CO]^+$ / $[Leu+MeAsp+Arg+Adda+H - CO_2]^+$, m/z 710 $[MeAsp+Arg+Adda+Glu+H - H_2O]^+$, m/z 728 $[MeAsp+Arg+Adda+Glu+H]^+$ und m/z 852 $[M+H - MeAsp]^+$ (Abb. 47).

Im Falle einer Desmethylierung an Position 3 bestünde die Notwendigkeit der Unterscheidung der Isomere Mdha und Dhb an Position 7. MS³-Spektren der Ionenfalle bieten zumindest theoretisch die Möglichkeit der Identifikation der entsprechenden Aminosäuren. Insbesondere kann Mdha im Gegensatz zu Dhb Methylamin abspalten und Fragmente mit einem Massenverlust von m/z 31 bilden. Praktisch erfolgte jedoch die Fragmentierung so diffus, dass eine Zuordnung potentieller Fragmente nicht möglich war. Hingegen ermöglichten MS²-Spektren der dm-NOD-Fraktion von *N. spumigena* (Ostsee, 2004) bei m/z 811,5 die Identifikation der dominanten Strukturvariante [Asp¹]NOD anhand der spezifischen Fragmente m/z 227 [Glu+Mdhb+H]⁺, m/z 289 [Asp+Arg+2H+NH₂]⁺ und m/z 389 [C₁₁H₁₅O+Glu+Mdhb]⁺ (Abb. 48).

Abb. 48 MS²-Spektrum von dm-NOD ($t_R = 4,6$ min) mittels LC-MS-Ionenfalle (Bruker Daltonics Esquire HCT) bei m/z 811,5 [M+H]⁺: Nachweis von [Asp¹]NOD

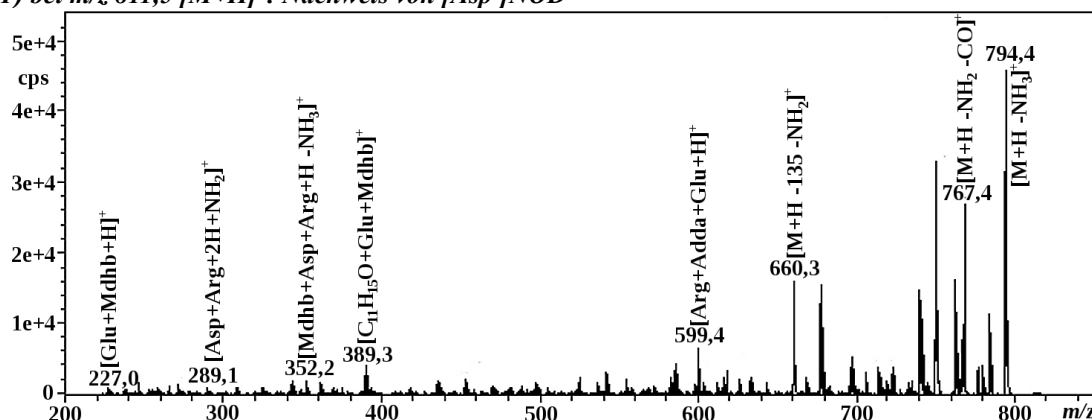
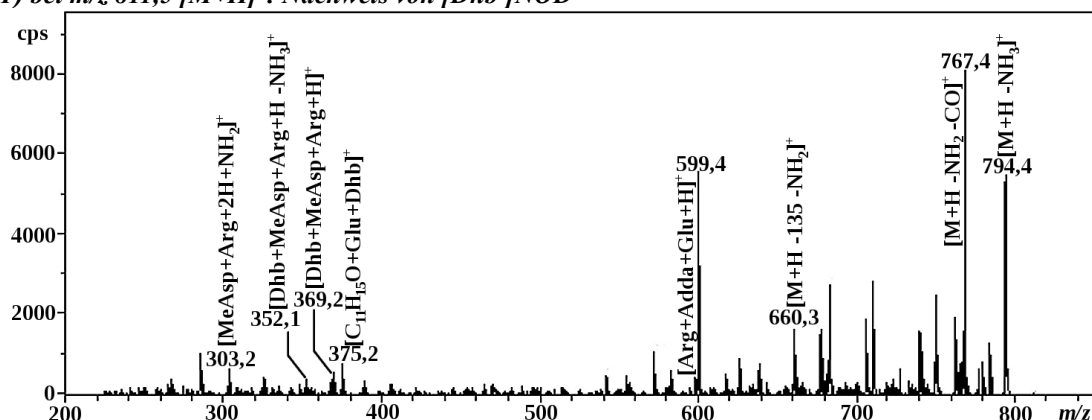


Abb. 49 MS²-Spektrum von dm-NOD ($t_R = 5,2$ min) mittels LC-MS-Ionenfalle (Bruker Daltonics Esquire HCT) bei m/z 811,5 [M+H]⁺: Nachweis von [Dhb⁵]NOD



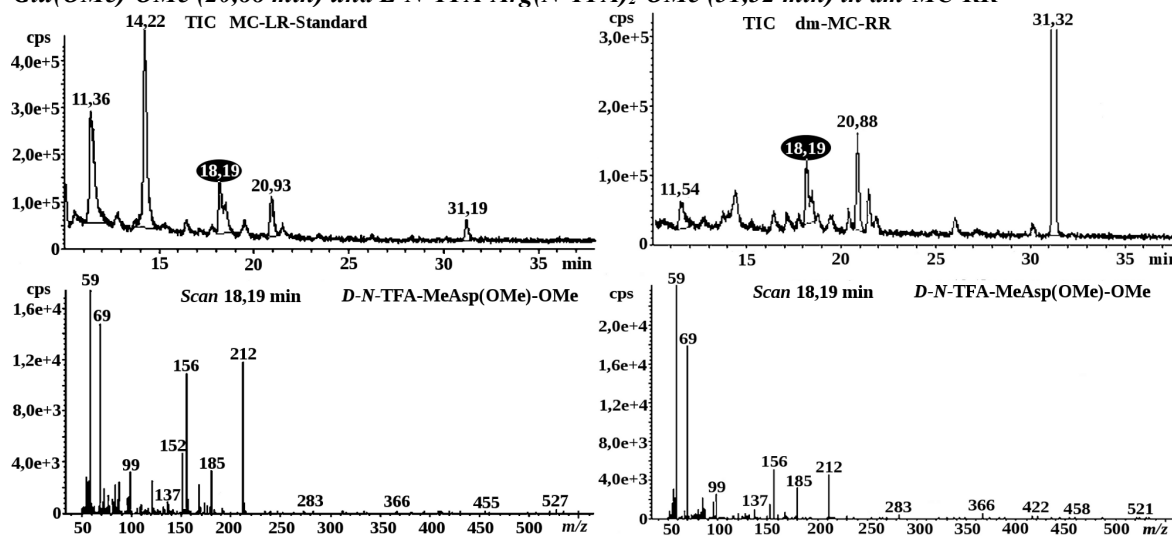
Im Gegensatz zur Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie ist der Nachweis von kleineren Fragmenten ($m/z < 220$ amu) nicht möglich („low-mass cut-off“), jedoch ist die Detektion der spezifischen Fragmente im Scan-Modus wesentlich empfindlicher im Vergleich zur klassischen Tandem-Massenspektrometrie, die eine höhere Nachweisempfindlichkeit im MRM-Modus unter Detektion spezifischer Massenübergänge aufweist. Dadurch wurde

eine Strukturanalyse der geringer konzentrierten Desmethyl-Variante (Abb. 41) möglich, welche den eindeutigen Nachweis von $[\text{Dhb}^5]\text{NOD}$ mit Hilfe von m/z 303 $[\text{MeAsp}+\text{Arg}+2\text{H}+\text{NH}_2]^+$ und m/z 375 $[\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}+\text{Glu}+\text{Dhb}]^+$ ergab (Abb. 49). Dabei zeigte der Vergleich der HPLC-Säule Luna PFP mit der HPLC-Säule Luna C18(2) eine Umkehr der Elutionsreihenfolge von $[\text{Asp}^1]\text{NOD}$ und $[\text{Dhb}^5]\text{NOD}$.

5.3.4.3 Analyse der Peptidkomposition mittels GC-MS

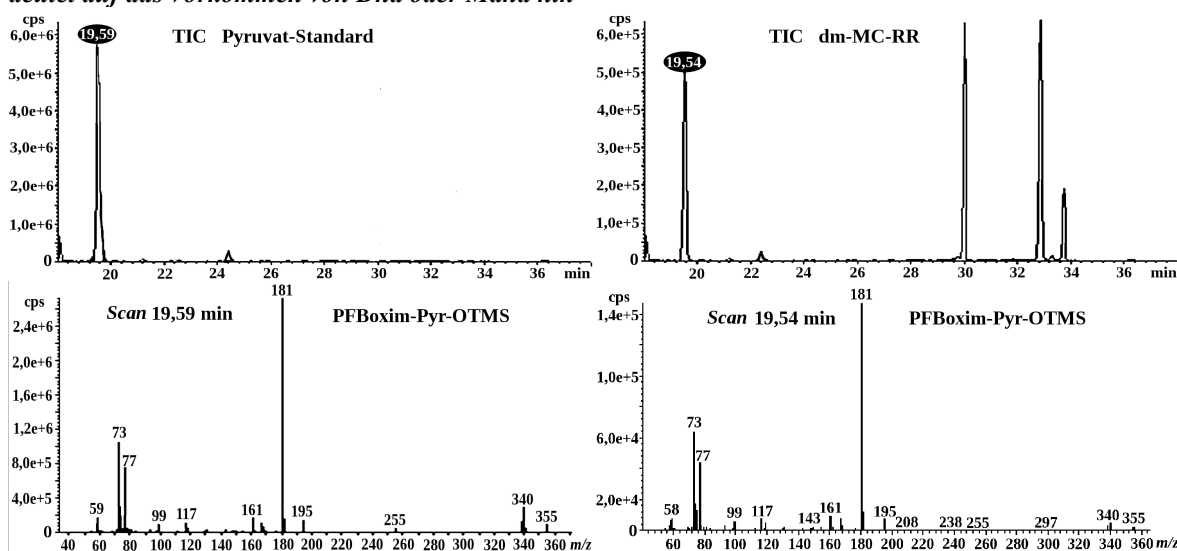
Die entwickelte Methode zur stereospezifischen GC-MS-Bestimmung der am Aufbau der zyklischen Peptide beteiligten Aminosäuren nach Hydrolyse und Derivatisierung der resultierenden freien Amino- und Ketosäuren ermöglichte u.a. die Unterscheidung der Isomere Mdha und Dhb an Position 7 der zyklischen Heptapeptide $[\text{Asp}^3]\text{MC-RR}$ und $[\text{Asp}^3, \text{Dhb}^7]\text{MC-RR}$. Da nur etwa 40-50 μg des Analyten für die Strukturanalyse benötigt werden, stellt diese Methode eine Alternative zur NMR-Spektroskopie, für die zuweilen bis zu 1 mg des Analyten benötigt werden, dar. Nach Hydrolyse der dm-MC-RR-Fraktion wurden MeAsp, D-Ala, D-Glu und L-Arg eindeutig als ihre entsprechenden N-TFA-Aminosäure-O-Me-Derivate nachgewiesen (Abb. 50). Außerdem wurde ein MC-LR-Standard als Referenzsubstanz für den Nachweis von D-MeAsp getestet. Dadurch wurde zugleich die Anwendbarkeit der Methode für Microcystine, die L-Leucin enthalten, demonstriert (Abb. 50).

Abb. 50 GC-MS-Bestimmung der derivatisierten Aminosäuren mit der chiralen Kapillarsäule Lipodex E nach Hydrolyse eines MC-LR-Standards (links) sowie der dm-MC-RR-Fraktion (rechts): Nachweis von D-N-TFA-Ala-OMe (11,36 min), L-N-TFA-Leu-OMe (14,22 min), D-N-TFA-MeAsp(OMe)-OMe (18,19 min), D-N-TFA-Glu(OMe)-OMe (20,93 min) und L-N-TFA-Arg(N-TFA)₂-OMe (31,19 min) in MC-LR sowie von D-N-TFA-Ala-OMe (11,54 min), D-N-TFA-MeAsp(OMe)-OMe (18,19 min), D-N-TFA-Glu(OMe)-OMe (20,88 min) und L-N-TFA-Arg(N-TFA)₂-OMe (31,32 min) in dm-MC-RR



Die charakteristische Aminosäure Adda ist hingegen säurelabil und war folglich nach der Hydrolyse nicht mehr nachweisbar. Ferner wurde Brenztraubensäure eindeutig als PFBoxim-Pyr-OTMS-Derivat mittels GC-MS nachgewiesen (Abb. 51). Brenztraubensäure deutete auf das Vorkommen von Mdha oder Dha hin. Dhb lag demnach nicht vor. Da mittels LC-MS/MS eine Desmethylierung von Adda ausgeschlossen werden konnte und *D*-MeAsp eindeutig nachweisbar war, wurde das Vorkommen von Dha an Position 7 des zyklischen Heptapeptids bestätigt. Somit konnte das dm-MC-RR in *M. aeruginosa* aus dem Senftenberger See (2005) eindeutig als [Dha⁷]MC-RR identifiziert werden.

Abb. 51 GC-MS-Bestimmung eines Pyruvat-Standards sowie eines Hydrolysats der dm-MC-RR-Fraktion mit der chiralen Kapillarsäule Lipodex E nach Derivatisierung: Der Nachweis von PFBoxim-Pyr-OTMS deutet auf das Vorkommen von Dha oder Mdha hin



5.4 Optimierung einer Multikomponentenmethode zur flüssigchromatografischen Trennung und massenspektrometrischen Detektion cyanobakterieller Toxine

5.4.1 Chromatografische Trennung von Anatoxin-a und Phenylalanin

Bei Einsatz einer Screening- bzw. Multikomponentenmethode für cyanobakterielle Toxine ist die eindeutige Identifikation der unterschiedlich polaren Analyten von einer ausgewogenen Retention im chromatografischen System abhängig. Dabei zeigt sich bei der Entwicklung hochspezifischer massenselektiver Detektoren für die Routineanalytik die Tendenz zur Minimierung der Analysenzeiten. Diese werden neben der Zeit für die Probenaufbereitung maßgeblich vom zeitlichen Aufwand für die chromatografische Trennung beeinflusst, dessen Bedeutung meist unterschätzt wird. Dies wurde nicht zuletzt an zahlreichen Fällen einer Verwechslung von Phenylalanin und Anatoxin-a auf Basis der massenspektrometrischen Detektion des Molekular-Ions $[M+H]^+$ bei m/z 166 amu deutlich. Die chromatografische Trennung von ANA und Phe ist jedoch die Voraussetzung zur

eindeutigen LC-MS-Bestimmung des cyanobakteriellen Neurotoxins ANA. Das Analyseverfahren nach Hiller et al. (2007) sieht die Anwendung der HPLC-Säule Phenomenex Luna C18(2) vor. Eine spezifische Bestimmung von ANA ist mit dieser Methode aber nicht möglich, da auf der apolaren stationären Phase für ANA keine hinreichende Retention erreicht wird (Abb. 52). Dies gilt gleichermaßen für die HPLC-Säule Supelco Supelcosil™ ABZ⁺, basierend auf einer stationären Alkyl-Amid-Umkehrphase (Abb. 52). Gugger et al. (2005) postulierten, dass bei Anwendung der HPLC-Säule Agilent Zorbax SB-C18 eine deutliche Trennung von ANA ($t_R = 5,2$ min) und Phe ($t_R = 9,2$ min) erreicht wird. Unter exakt identischen chromatografischen Bedingungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte indes lediglich eine Antrennung von ANA ($t_R = 4,4$ min) und Phe ($t_R = 4,8$ min) ohne Basislinienauflösung erreicht werden (Abb. 52), jedoch ermöglicht die HPLC-Säule Phenomenex Luna HILIC auf der Basis der Hydrophilen Interaktions-Flüssigchromatografie eine deutliche Trennung beider Analyten (Abb. 52/IV).

Abb. 52 Chromatografische Trennung von ANA (1) und Phe (2) mit den HPLC-Säulen (I) Agilent Zorbax SB-C18, (II) Supelco Supelcosil™ ABZ⁺, (III) Phenomenex Luna C18(2) und (IV) Phenomenex Luna HILIC

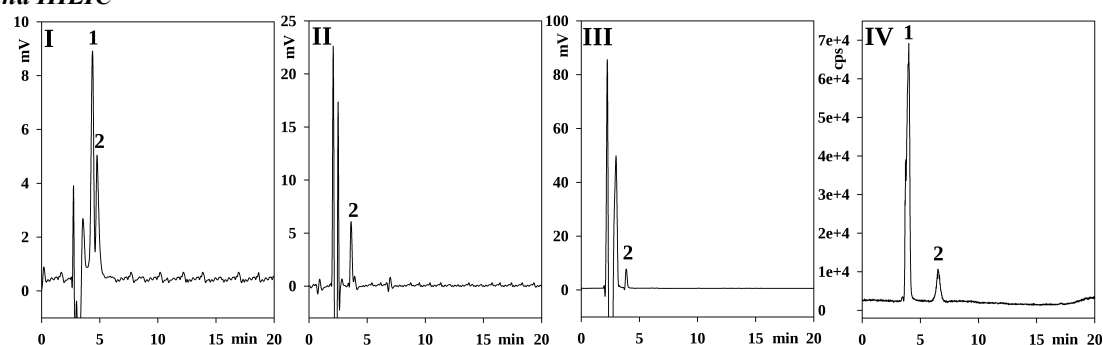
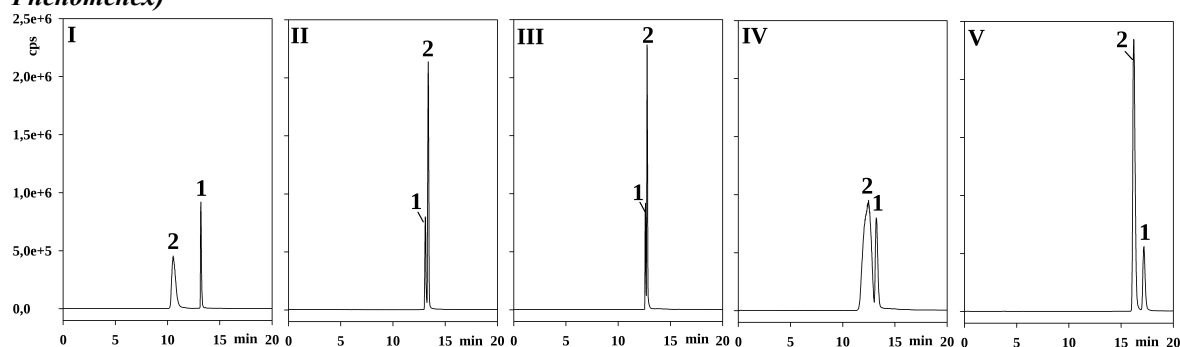


Abb. 53 Chromatografische Trennung von ANA (1) und Phe (2) mit den HPLC-Säulen (I) Synergi® Polar-RP, (II) Synergi® Fusion-RP, (III) Luna Phenyl-Hexyl, (IV) Luna PFP und (V) Aqua (alle Phenomenex)



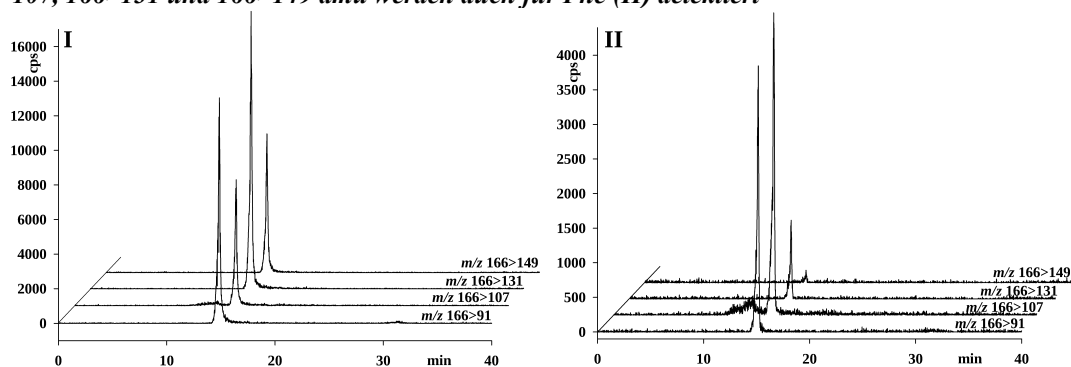
Allerdings wurde wegen des begrenzten Anwendungsspektrums für polare Analyten der Einsatz der HILIC-Säule im Kontext einer Multikomponentenmethode für cyanobakterielle Toxine mit Blick auf die unbedingt notwendige Berücksichtigung der weniger polaren

Microcystine ausgeschlossen. Folglich wurde zur Erhöhung der Retention der polaren Analyten weiterhin mit RP-Säulen gearbeitet, jedoch mussten diese auch die Verwendung einer 100% wässrigen mobilen Phase gestatten. Dabei konnte insbesondere mit den HPLC-Säulen Synergi® Polar-RP und Aqua eine Basislinientrennung von ANA und Phe erreicht werden, und folglich wurden diese Säulen für den Einsatz im Rahmen der Multikomponentenmethode präferiert (Abb. 53).

5.4.2 Massenspektrometrische Fragmentation von Anatoxin-a und Phenylalanin

Die tandemmassenspektrometrische Detektion von ANA bei m/z 166 amu $[M+H]^+$ auf Basis der charakteristischen Produkt-Ionen m/z 149 $[M+H - NH_3]^+$, 131 $[M+H - NH_3 - H_2O]^+$, 107 $[M+H - NH_3 - CH_2CO]^+$ und 91 $[M+H - NH_3 - H_2O - CH_3CCH]^+$ ist insofern problematisch, weil jene Massenübergänge, wenn auch mit unterschiedlicher Signalintensität, ebenfalls zur Detektion von Phe herangezogen werden können (Abb. 54). Folglich sollten im PIS-Modus die Kollisionsenergie (CE), das Kollisionszellen-Austrittspotenzials (CXP) und die Ionisierungsspannung (IS) variiert werden, um geeignete MS-Parameter zur differenzierenden Detektion über charakteristische Fragmente zu ermitteln. Dabei wurden nur Produkt-Ionen mit einer Signalintensität >2000 cps für ANA oder Phe berücksichtigt, um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten.

Abb. 54 Charakteristische Massenübergänge (LC-MS/MS im MRM-Modus) für ANA (I) bei m/z 166 $>$ 91, 166 $>$ 107, 166 $>$ 131 und 166 $>$ 149 amu werden auch für Phe (II) detektiert



Im Rahmen der Detektion von ANA wies insbesondere das Fragment m/z 43 $[CH_3CO]^+$ bei CE 20-60 V, CXP 5-45 V und IS 2500-4500 V eine große Spezifität auf. Mit Einschränkungen können unter entsprechender Konfiguration die Fragmente m/z 105 $[M+H - NH_3 - CH_3CHO]^+$ bei CXP 25 V, m/z 131 $[M+H - NH_3 - H_2O]^+$ bei CXP 5 V und IS 2500 V bzw. 4500 V sowie m/z 149 $[M+H - NH_3]^+$ bei CE 30 V, CXP 5-25 V und IS 3500 V zur spezifischen Detektion von Anatoxin-a verwendet werden (Tab. 16-17). In Übereinstimmung mit Furey et al. 2005 sind für Phenylalanin insbesondere die Fragmente m/z 103 $[M+H - HCOOH - NH_3]^+$ bei CE 30-60 V, CXP 5-45 V und IS 2500-4500 V sowie

m/z 120 $[M+H - HCOOH]^+$ bei CE 10-45 V, CXP 5-45 V und IS 2500-4500 V hochspezifisch (Tab. 16-17). Hinsichtlich einer Bestimmung von ANA mittels einfacher LC-MS ist es indes bedeutsam, dass im Zuge der Elektrospray-Ionisierung von Phe das Fragment m/z 120 regulär gebildet wird und eine größere Signalintensität ($>$ Faktor 10) als das entsprechende Molekular-Ion aufweist. Unabhängig von der chromatografischen Trennung bestünde folglich im Rahmen der Routineanalytik die Möglichkeit einer massenspektrometrischen Differenzierung von ANA und Phe auf Basis der Relationen der Signalintensität zwischen m/z 120 und m/z 166.

Tab. 16 Vergleich der Peakintensitäten (cps) der MS/MS-Fragmente von 5 ng ANA und 50 ng Phe bei variablen Kollisionsenergien (CE), *Relation der Peakintensitäten (ANA/Phe bzw. Phe/ANA) $> 95\%$, ** Kontrollparameter

m/z	CE 10 V		CE 20 V		CE 30 V**		CE 45 V		CE 60 V		CE 90 V		CE 120 V	
	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe
43	-	-	4860*	-	10700*	215	16844*	815	6383*	171	2213	171	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	206	3085	457	5998	521	2475
73	2311	760	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	2210	22603	1573	16623	433	2434	-	-
79	-	-	-	-	2131	4489	3945	2151	-	-	-	-	-	-
91	-	-	5900	477	7503	3575	8059	12487	1123	5107	-	-	-	-
93	-	-	-	-	1982	10672	561	3520	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	997	14784	562	7198	-	-	-	-
103	-	-	-	-	171	21414*	706	48059*	46	3805*	-	-	-	-
105	-	-	2944	179	2835	403	-	-	-	-	-	-	-	-
107	-	-	6730	2682	3612	2635	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-	187	2853	-	-	-	-	-	-
120	135	100848*	152	71681*	171	52881*	-	6892*	-	-	-	-	-	-
131	-	-	10674	6020	5021	376	-	-	-	-	-	-	-	-
149	12398	7110	22876	1281	2705*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
166	140763	157282	30064	1937	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

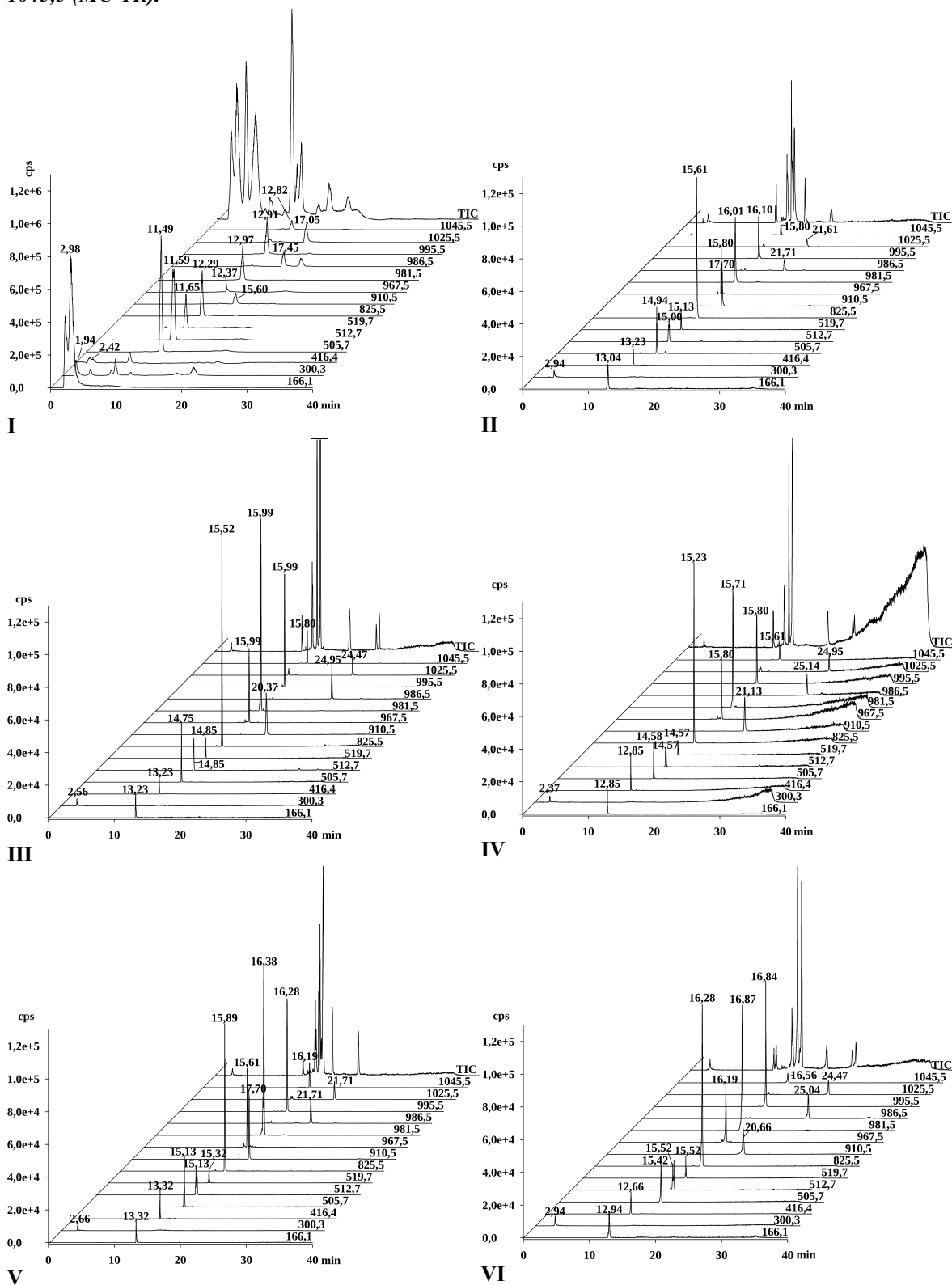
Tab. 17 Vergleich der Peakintensitäten (cps) der MS/MS-Fragmente von 5 ng ANA und 50 ng Phe bei variablen Kollisionszellen-Austrittspotenzialen (CXP) und Ionisierungsspannungen (IS), *Relation der Peakintensitäten (ANA/Phe bzw. Phe/ANA) $> 95\%$, ** Kontrollparameter

m/z	CXP 5 V		CXP 15 V**		CXP 25 V		CXP 45 V		IS 2500 V		IS 3500 V**		IS 4500 V	
	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe	ANA	Phe
41	-	-	-	-	343	2217	-	-	-	-	-	-	-	-
43	14167*	309	10700*	215	10992*	379	5865*	108	5930*	-	10700*	215	6336*	-
45	-	-	-	-	983	2188	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	594	5542	-	-	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	571	5367	-	-	-	-	-	-	1890	2381
79	3852	6341	2131	4489	2411	3909	1879	2020	1611	2355	2131	4489	-	-
91	9292	4147	7503	3575	6311	2071	3758	1696	3976	1888	7503	3575	4409	1768
93	1893	10728	1982	10672	2434	5630	1197	4799	2091	5203	1982	10672	667	3608
103	823	45689*	171	21414*	343	22403*	150	19374*	630	17893*	171	21414*	419	10607*
105	3090	788	2835	403	3097*	146	-	-	-	-	2835	403	-	-
107	4135	2505	3612	2635	3782	1634	2183	1696	2194	1230	3612	2635	2112	1155
120	251	102722*	171	52881*	137	66129*	374	49464*	185	38845*	171	52881*	152	29657*
131	6616*	274	5021	376	5957	379	3961	253	4833*	211	5021	376	3187*	108
149	2133*	69	2705*	-	2411*	-	-	-	-	-	2705*	-	-	-

5.4.3 Chromatografische Trennung von Multitoxingemischen

Zur Optimierung der Multikomponentenmethode für cyanobakterielle Toxine wurden die HPLC-Säulen Synergi® Polar-RP (Ether-linked Phenyl-Phase), Synergi® Fusion-RP (Polar embedded C18-Phase), Luna Phenyl-Hexyl (-Phase), Luna PFP (Pentfluorphenylpropyl-Phase) und Aqua (C18-Phase mit polar endcapping) von Phenomenex getestet.

Abb. 55 LC-MS-Bestimmung eines Rohextrakts von *Microcystis aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) und *Nodularia spumigena* (Ostsee, 2004), vermischt mit Standardlösungen von ANA, STX, CYN, NOD sowie MC-RR, -LA, -LF, -LR, -LW und -YR unter Einsatz der HPLC-Säulen (I) Luna C18(2) (II) Synergi® Polar-RP, (III) Synergi® Fusion-RP, (IV) Luna Phenyl-Hexyl, (V) Luna PFP und (VI) Aqua (alle 250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) bei m/z 166,1 (ANA), 300,3 (STX), 416,4 (CYN), 505,7 ([Asp³,Dha⁷]MC-RR), 512,7 ([Dha⁷]MC-RR), 519,7 (MC-RR), 825,5 (NOD), 910,5 (MC-LA), 967,5 ([Asp³,Dha⁷]MC-LR), 981,5 ([Dha⁷]MC-LR), 986,5 (MC-LF), 995,5 (MC-LR), 1025,5 (MC-LW) und 1045,5 (MC-YR).



Im Vergleich zur Säule Luna C18(2) sind diese HPLC-Säulen auch bei Verwendung von 100 % wässrigen Pufferlösungen weitgehend stabil und ermöglichen neben der Trennung von ANA und Phe ein breiteres Anwendungsspektrum speziell für polare Analyten. Dadurch ergab sich für diese HPLC-Säulen eine hohe Retention für ANA und CYN (Abb. 55). Allerdings wurden für STX als Repräsentant der sehr polaren PSP-Toxine kaum Wechselwirkungen mit der stationären Phase erreicht ($t_R = 2,37\text{--}2,94$ min). Außerdem wurde deutlich, dass bei einer ausgewogenen chromatografischen Trennung der einzelnen Toxingruppen keine chromatografische Trennung der Microcystine von ihren einfach desmethylierten Strukturvarianten möglich ist, jedoch ergeben sich wegen der Möglichkeit einer massenselektiven Detektion der Hepatotoxine dadurch keine Einschränkungen hinsichtlich der spezifischen Identifikation auch dieser Analyten. Die höchste Stabilität (konstante Retentionszeiten nach 10 Testläufen) und die beste Trennleistung wies dabei die HPLC-Säule Aqua (Phenomenex, Torrance, CA, USA) unter Verwendung von 5 mM Ammoniumformiat und 53 mM Ameisensäure in (A) H₂O und (B) ACN/H₂O (90/10; v/v) sowie einer Gradientenelution (0-5 min 0 % B, 9-18 min 60 % B, 27-29 min 100 % B, 30-40 min 0 % B) bei einer konstanten Flussrate von 1 ml min⁻¹ auf (Abb. 55). Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die entwickelte Multikomponentenmethode nicht nur als Screening-Methode einsetzbar ist, sondern sich mit Ausnahme der PSP-Toxine auch hervorragend zur exakten Quantifizierung cyanobakterieller Toxine aus unterschiedlichen Matrices eignet.

5.4.4 Chromatografische Trennung von Multitoxingemischen unter Einsatz des Ionenpaarreagenzes Tridecafluorheptansäure (TDFHA)

Aufgrund der geringen Retention der sehr polaren PSP-Toxine an den getesteten RP-Phasen sollte der Einfluss von Tridecafluorheptansäure (TDFHA) als MS-taugliches Ionenpaarreagenz untersucht werden. Zuvor wurden von Hiller (2007) die perfluorierten Carbonsäuren Trifluoressigsäure (TFA) und Heptafluorbuttersäure (HFBA) untersucht. Diese bewirkten neben einer verbesserten Retention für polare Analyten aber auch eine erhöhte Ionensuppression unter Anwendung der Elektrospray-Ionisierung. Indes beschrieben Armstrong et al. (2007) eine exzellente Trennleistung durch Zusatz von TDFHA in der mobilen Phase. Eine Ionensuppression wurde lediglich bei einer Koelution von Analyten mit dem TDFHA-Natriumaddukt beobachtet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Zusatz von TDFHA zur mobilen Phase optimiert, und der Einsatz von 0,75 mM TDFHA und 0,375 mM NH₃ ergab eine deutliche

Erhöhung der Retention und der Nachweisempfindlichkeit der PSP-Toxine sowie eine ausgewogene chromatografische Trennung (einschließlich ANA und Phe) mit stabilen Retentionszeiten für alle zu bestimmenden cyanobakteriellen Toxine (Abb. 56-58, Tab. 18).

Abb. 56 LC-MS-Bestimmung eines Rohextrakts von *Microcystis aeruginosa* (Senftenberger See, 2005) und *Nodularia spumigena* (Ostsee, 2004), vermischt mit Standardlösungen von ANA, STX, CYN, NOD sowie MC-RR, -LA, -LF, -LR, -LW und -YR unter Einsatz der HPLC-Säulen (I) Aqua und (II) Synergi® Polar-RP (alle 250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) bei m/z 166,1 (ANA), 300,3 (STX), 416,4 (CYN), 505,7 ([Asp³,Dha⁷]MC-RR), 512,7 ([Dha⁷]MC-RR), 519,7 (MC-RR), 825,5 (NOD), 910,5 (MC-LA), 967,5 ([Asp³,Dha⁷]MC-LR), 981,5 ([Dha⁷]MC-LR), 986,5 (MC-LF), 995,5 (MC-LR), 1025,5 (MC-LW) und 1045,5 (MC-YR).

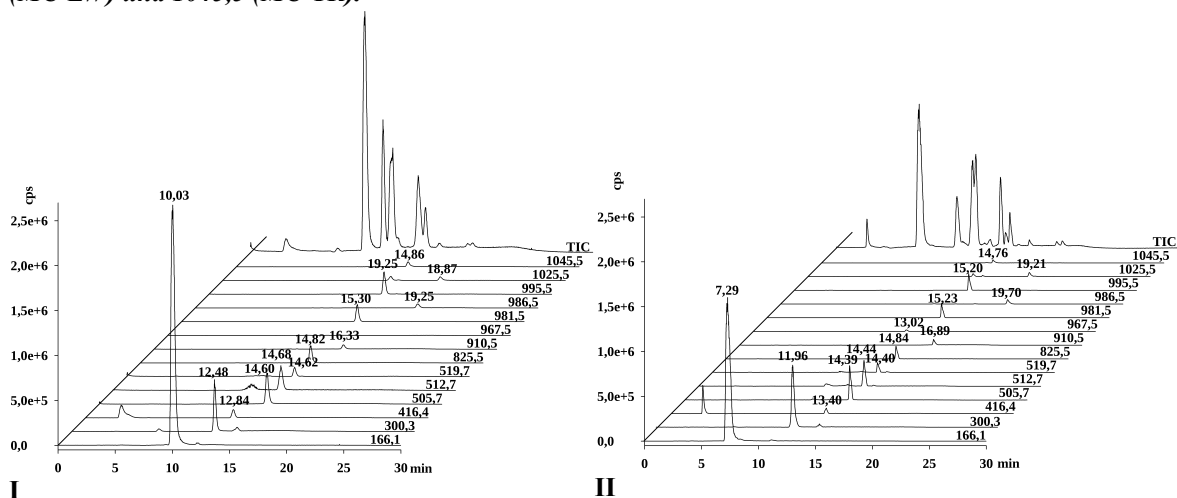
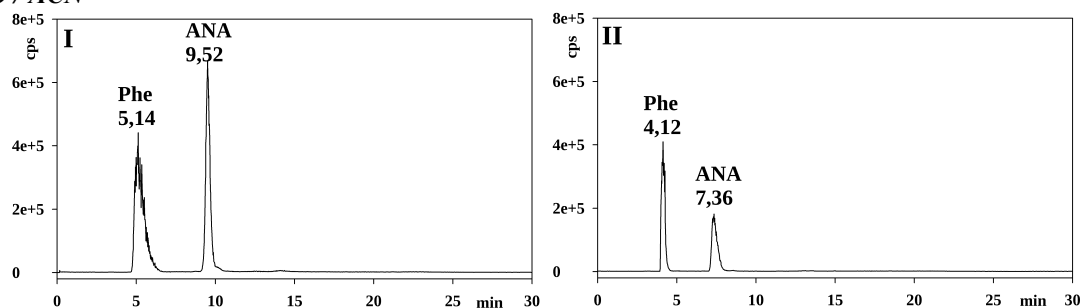
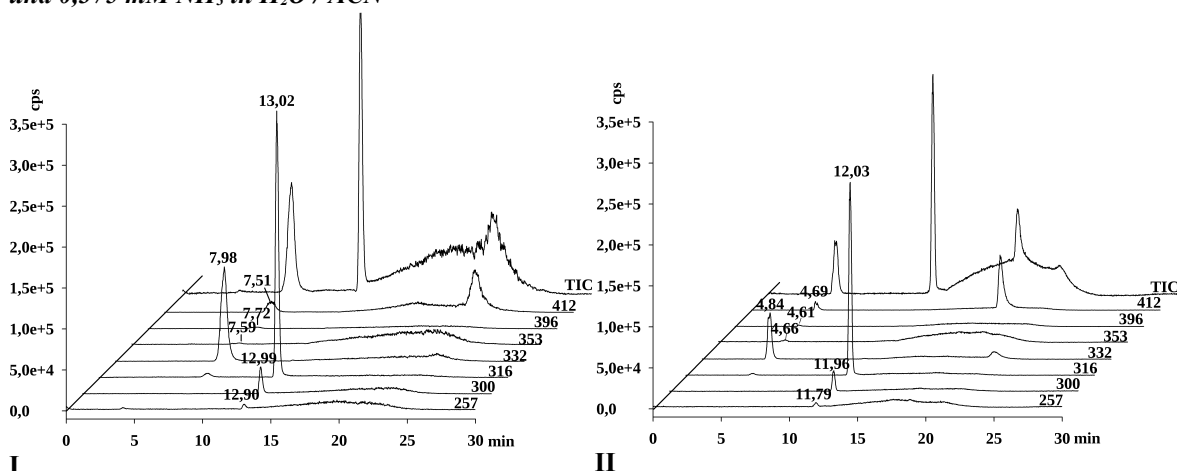


Abb. 57 LC-MS-Bestimmung von ANA und Phe bei m/z 166,1 mittels der HPLC-Säulen (I) Aqua und (II) Synergi® Polar-RP und einer mobilen Phase bestehend aus 0,75 mM TDFHA und 0,375 mM NH_3 in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$



Nach 40 chromatografischen Läufen war jedoch eine Abnahme der Signalintensitäten (Peakhöhe, cps) um etwa 50 % zu beobachten. Gründliches Spülen der HPLC-Säule und vor allem die Reinigung im Q0-Bereich des Massenspektrometers kompensieren jedoch diesen Effekt. Gleichsam schränkt dieser Umstand die Anwendung der Methode ein, wenn die Quantifizierung der nachgewiesenen Toxine in einer großen Anzahl von Proben erfolgen muss, vor allem im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Standard-Kalibrierung. Deshalb empfiehlt sich der Einsatz von TDFHA nur im Falle einer Berücksichtigung von PSP-Toxinen.

Abb. 58 LC-MS-Bestimmung von PSP-Toxinen bei m/z 257 (dcSTX), 300 (STX), 316 (NEO), 332 (GTX1/4, $[M+H-SO_3]^+$), 353 (dcGTX2/3), 396 (GTX2/3) und 412 (GTX1/4, $[M+H]^+$) mittels der HPLC-Säulen (I) Aqua und (II) Synergi® Polar-RP und einer mobilen Phase bestehend aus 0,75 mM TDFHA und 0,375 mM NH_3 in H_2O/ACN



5.4.5 Bestimmung der Nachweisgrenzen

Die Nachweisgrenzen für die cyanobakteriellen Toxine bei Anwendung der Multikomponentenmethode mit variierenden mobilen und stationären Phasen und nach Detektion mit Hilfe des API 165 Massenspektrometers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sind in Tab. 18 dargestellt. Dabei zeigt sich besonders die deutliche Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für Anatoxin-a und PSP-Toxine unter Einsatz des Ionenpaarreagenzes TDFHA, sowohl für die HPLC-Säule Aqua als auch für die HPLC-Säule Synergi® Polar-RP. Die Nachweisempfindlichkeit für die Peptidtoxine war unter Verwendung von TDFHA etwas geringer, möglicherweise verursacht durch ein höheres Rauschen der Basislinie.

Tab. 18 Vergleich der Nachweisgrenzen (ng je Injektion) für cyanobakterielle Toxine im Rahmen der Multikomponentenmethoden unter Einsatz der HPLC-Säulen Phenomenex Aqua und Polar-RP mit und ohne Verwendung von TDFHA

Methode (HPLC-Säule / Puffer)	ANA	dcSTX	STX	NEO	CYN	NOD	MC-RR	MC-LA	MC-LF	MC-LR	MC-LW	MC-YR
Aqua / $HCOOH$ & $HCOONH_4$	0,10	4,40	4,25	4,20	1,03	0,05	0,10	0,20	0,11	0,03	0,09	0,09
Polar-RP / $HCOOH$ & $HCOONH_4$	0,07	6,25	6,15	6,15	1,95	0,06	0,11	0,12	0,23	0,07	0,16	0,07
Aqua / TDFHA & NH_3	0,01	0,92	1,20	0,41	0,40	0,15	0,23	0,41	0,35	0,16	0,28	0,25
Polar-RP / TDFHA & NH_3	0,02	0,69	0,98	0,50	0,45	0,22	0,22	0,35	0,31	0,23	0,33	0,34

6. Zusammenfassung

Massenvorkommen von Cyanobakterien sind ein weltweites Phänomen, das durch hohe Temperaturen, Eutrophierung, alkalische Milieus und geringe bis moderate Salzgehalte der Brack- und limnischen Gewässer begünstigt wird. Cyanobakterien können hierbei ein vielfältiges Spektrum von Toxinen produzieren, die sich in ihrer chemischen Struktur, hinsichtlich des toxikologischen Wirkmechanismus und der biologischen Bedeutung unterscheiden. In diesem Zusammenhang wurden Intoxikationen nach vielfältigen Expositionsformen bei Tieren und Menschen beobachtet.

(I) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss modifizierter Kulturmedien auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Microcystis aeruginosa* AB2005/31 und *Anabaena flos-aquae* SAG30.87 untersucht. Dabei umfassten die Messungen abiotischer Faktoren die Variation der Nitrat-N- ($0-247,2 \text{ mg l}^{-1}$) und Phosphat-P-Gehalte ($0,6-9,0 \text{ mg l}^{-1}$) sowie des pH-Wertes ($7,5-10,5$) im Medium. Der Einfluss biotischer Faktoren wurde exemplarisch mit 50 % gebrauchtem Medium von *Synechocystis sp.* SAG92.79 untersucht. Außerdem sollte eine Methode zur Kryopreservation von Cyanobakterien entwickelt und auf ihr Potenzial zur Reaktivierung des Wachstums und der Toxinproduktion geprüft werden. Während der Dauer eines Experiments von jeweils 6 Wochen wurde das Wachstum der cyanobakteriellen Kulturen wöchentlich unter Bestimmung der Trockenmasse und des Chlorophyll-*a*-Gehaltes verfolgt. Die Toxingehalte wurden in Abständen von 2 Wochen mittels LC-MS analysiert. Das Toxinprofil von *M. aeruginosa* AB2005/31 umfasste zu 79 % die Strukturvarianten MC-RR und MC-LR. Weiterhin wurde die Bildung von dm-MC-RR, dm-MC-LR, MC-LA, dm-MC-LA und MC-YR im Verlaufe der Kultivierung verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass geringe Phosphat-P-Gehalte von $0,6 \text{ mg l}^{-1}$ und der alkalische pH-Wert von 10,5 im Medium das Wachstum und die Toxinproduktion von *M. aeruginosa* AB2005/31 stimulierten, während das Nitrat-Experiment keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich einer Steigerung des Wachstums oder der Toxinproduktion zuließ. Unterdessen zeigte sich, dass eine Nitratlimitierung von *Microcystis* und *Anabaena* eine signifikant niedrigere Biomasse- und MC-Produktion bewirkt. Folglich ist für das Wachstum der Cyanobakterien eine geeignete Stickstoffquelle unerlässlich. Phosphatlimitierung führte zur deutlichen Verringerung des Gehaltes an Chlorophyll-*a*, ohne jedoch die Biomasseproduktion negativ zu beeinflussen. Die Verringerung des pH-Wertes auf 7,5 verursachte gleichermaßen eine Abnahme des Chlorophyll-Gehaltes und der Trockenmasse. Indes wurde für *A. flos-aquae* SAG30.87 im neutralen Milieu eine

Verzögerung der allgemeinen Tendenz zur Abnahme der Biosynthese von Anatoxin-a beobachtet. Dabei zeigte sich eine Diskrepanz zwischen den optimalen Bedingungen für das Wachstum und die Toxinproduktion. Im Rahmen des Experiments zum Einfluss biotischer Faktoren konnten hierzu aber keine eindeutigen Aussagen abgeleitet werden, da die Toxingehalte sowohl in der Kontrolle als auch in der behandelten Probe sehr gering waren. Dieser Beobachtung lag eine allgemeine Tendenz einer generellen Abnahme der Toxinproduktion von Cyanobakterien unter Bedingungen der Kultivierung zugrunde, welche auch von anderen Autoren dokumentiert wurde. Insbesondere war *Anabaena flos-aquae* SAG30.87 für die Experimente aufgrund einer bisweilen sprunghaften Abnahme der Toxinproduktion wenig geeignet. Allerdings kann dem Verlust der Vitalität sowie der Fähigkeit zur Toxinbiosynthese und der Gefahr von Fremdkontaminationen im Rahmen der regulären Kultivierung durch die Methode der Gefrierkonservierung entgegengewirkt werden. Alle Kulturen ließen sich nach einem Gefrier-Tau-Zyklus erfolgreich reaktivieren, und insbesondere für *Microcystis* konnte die Konservierung der Microcystin-Produktion demonstriert werden. Dabei ist jedoch die schnelle Entfernung des Kryoprotektanten eine notwendige Bedingung für den Erhalt der Vitalität sowie der Fähigkeit zur Toxinproduktion.

(II) Zur Bestimmung von β -N-Methylamino-L-Alanin (BMAA) und 2,4-Diaminobuttersäure (DAB) in Cyanobakterien und Pflanzensamen wurde eine hochselektive LC-MS/MS-Methode entwickelt. Die flüssigchromatografische Trennung erfolgte auf Basis der Hydrophilen Interaktionsflüssigchromatografie (HILIC) mit der HPLC-Säule Luna HILIC (Phenomenex, Torrance, CA, USA) in Kombination mit einem Ameisensäure/Ammoniumformiat-Puffer (pH 3,0) in Wasser/Acetonitril. Für die tandemmassenspektrometrische Detektion im MRM-Modus waren die Massenübergänge m/z 119>102, 119>101, 119>88 und 119>44 zur sensitiven und selektiven Bestimmung der neurotoxischen Isomere besonders geeignet. Der Vergleich der neuen Methode mit zuvor publizierten LC-MS(/MS)-Methoden zur Bestimmung der underivatisierten Aminosäuren demonstrierte eine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit sowie der eindeutigen Detektion dieser neurotoxischen Isomere. Im Rahmen der Methodvalidierung konnte gezeigt werden, dass die Wiederfindungsraten der zugesetzten Aminosäuren nach der Probenaufbereitung zur Bestimmung der freien und gebundenen Formen besonders bei niedrigen Konzentrationen der Analyten ausreichend hoch sind. Unter Anwendung dieser Methode wurden zahlreiche freilebende Cyanobakterien sowie Nahrungsergänzungsmittel auf cyanobakterieller Basis untersucht. Dabei konnte die neurotoxische Aminosäure

BMAA in keiner der cyanobakteriellen Proben nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu zahlreichen Veröffentlichungen, die ein ubiquitäres Vorkommen von BMAA in diversen Cyanobakterientaxa postulieren. Dabei ist jedoch auffällig, dass in diesen Studien ausschließlich die fluorimetrische oder massenselektive Detektion nach Derivatisierung von BMAA angewendet wurde und die Bestimmung des neurotoxischen Isomers DAB sowie die ebenfalls mögliche Detektion anderer potenziell koelulierender Aminosäuren, die nach Derivatisierung übereinstimmende Masse-/Ladungsverhältnisse aufweisen, bei der Interpretation der Ergebnisse nicht berücksichtigt wurde. Bisher konnte BMAA mit Hilfe von hochselektiven LC-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von Aminosäuren in underivatisierter Form in Cyanobakterien nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit DAB in einigen Cyanobakterien in Konzentrationen von 0,07-0,83 $\mu\text{g g}^{-1}$ nachgewiesen werden. Folglich kann hinsichtlich der Risikobewertung von Nahrungsergänzungsmitteln auf cyanobakterieller Basis konstatiert werden, dass die mögliche Gefährdung durch eine Exposition mit den neurotoxischen Aminosäuren BMAA und DAB nach den vorliegenden Ergebnissen, vor allem im Vergleich mit der Problematik des Vorkommens hepatotoxischer Microcystine, als gering einzuschätzen ist.

(III) Nodularine und Microcystine sind zyklische Penta- und Heptapeptide, die als potente Inhibitoren der Proteinphosphatasen (PP) 1 und 2A hepatotoxisch wirken und zusammen mehr als 100 Strukturvarianten umfassen. Für die Überwachung von Trinkwasser und Nahrungsergänzungsmitteln sind jedoch nur MC-LR, -RR und -YR gemäß der Norm ISO 20179 rechtlich relevant. Diese Norm schreibt die Bestimmung der Microcystine mittels eines HPLC-UV-Verfahrens vor, das zur Identifikation der jeweiligen Strukturvarianten die entsprechende Retentionszeit als einziges Selektionskriterium zulässt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Anwendung dieses Verfahrens die Koelution der MCs mit ihren jeweiligen Desmethyl-Varianten zur Folge hat. Für eine adäquate Risikobewertung wurde eine chromatografische Trennung aller rechtlich relevanten MCs von den entsprechenden einfach und doppelt desmethylierten MCs angestrebt. Diese gelang mit Hilfe stationärer perfluorierter Phenylphasen in Kombination mit einer mobilen Phase, bestehend aus einem Ameisensäure/Ammoniumformiat-Puffer in Wasser/Acetonitril. Außerdem ermöglichte diese Methode die Trennung des Nodularins von zwei unterschiedlichen Desmethyl-NODs. Dabei bewies insbesondere die HPLC-Säule Luna PFP (Phenomenex, Torrance, CA, USA) eine überragende Stabilität durch konstante Retentionszeiten auch nach mehr als 100 chromatografischen Läufen. Unter

Anwendung dieses Verfahrens wurden durch semipräparative HPLC MC- und NOD-Fractionen gewonnen, um u.a. die exakte chemische Struktur der desmethylierten MC-Varianten zu ermitteln. Hierfür wurden zunächst zwei massenspektrometrische Verfahren, die Triple-Quadrupol-MS sowie die Ionenfallen-MS, hinsichtlich charakteristischer Fragmente miteinander verglichen. Dabei zeigten sich nur geringe Unterschiede im Fragmentierungsmuster, insbesondere das charakteristische Adda-Fragment bei m/z 135 amu konnte nicht mit Hilfe der Ionenfalle detektiert werden. Ferner wurde eine neue Methode zum stereospezifischen Nachweis der Aminosäuren des Peptidrings der Hepatotoxine angewendet, die u.a. eine Unterscheidung der Isomere Mdha und Dhb an Position 7 ermöglicht. Nach der Mikrowellen-unterstützten Hydrolyse wurden die resultierenden Amino- und Ketosäuren als ihre entsprechenden *N*-Trifluoracetyl-Aminosäure-*O*-Methylester- bzw. Pentafluorbenzyloxim-Ketosäure-Trimethylsilylester-Derivate mittels GC-MS bestimmt. Unter Anwendung der unterschiedlichen Methoden konnten die dominanten Desmethyl-Microcystine in *Microcystis aeruginosa* aus dem Senftenberger See (2005) eindeutig als [Dha⁷]MC-RR und [Dha⁷]MC-LR identifiziert werden. Außerdem wurde [Asp¹]NOD als dominantes dm-NOD in *Nodularia spumigena* (Ostsee, 2004) nachgewiesen.

(IV) Basierend auf der Methode von Hiller et al. (2007) sollte unter Berücksichtigung aller Toxingruppen eine Screening-Methode zur flüssigchromatografischen Trennung und massenspezifischen Detektion cyanobakterieller Toxine hinsichtlich der Retention polarer Analyten (ANA, CYN, PSP) optimiert werden. Zur eindeutigen Identifikation von Anatoxin-a auf Basis der routinemäßigen LC-MS(/MS)-Bestimmung bei m/z 166 sollte ferner die chromatografische Trennung des Neurotoxins von der proteinogenen Aminosäure Phenylalanin erreicht werden. Untersuchungen zur Fragmentierung der beiden Komponenten im Zuge der Ionisierung - in Abhängigkeit von der Ionen-Spray-Spannung - sowie in der Kollisionszelle (Q2) des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers - in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie und des Kollisionszellen-Austrittspotenzials - sollten eine eindeutige Identifikation von ANA ermöglichen. Zur massenselektiven Differenzierung eigneten sich für tandemmassenspektrometrische Analysen besonders die hochspezifischen Massenübergänge m/z 166>43 für ANA sowie m/z 166>103 und 166>120 für Phe. Auf der Basis eines Massenanalysators kann neben dem Molekular-Ion bei m/z 166 die für Phenylalanin charakteristische Masse bei m/z 120 zur eindeutigen Detektion von ANA neben Phe herangezogen werden. Somit kann eine Verwechslung der beiden Komponenten bei Einsatz einer LC-MS-Multikomponentenmethode verhindert

werden. Außerdem wurde die chromatografische Trennung von ANA und Phe durch den Einsatz von Umkehrphasen, die auch mit 100 % wässrigen Pufferlösungen ausreichend stabil sind, optimiert. Dabei ergab insbesondere die HPLC-Säule Aqua von Phenomenex eine exzellente Multikomponententrennung, einschließlich der Basislinientrennung von ANA und Phe. Trotz einer erfolgreichen Erhöhung der Retention von Anatoxin-a und Cylindrospermopsin blieb die Retention der sehr polaren PSP-Toxine an den getesteten RP-Phasen unzureichend. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss von Tridecafluorheptansäure (TDFHA) als MS-taugliches Ionenpaarreagenz untersucht, wobei der Zusatz von TDFHA zum Eluenten zu einer deutlichen Erhöhung der Retention und der Nachweisempfindlichkeit der PSP-Toxine sowie zu einer ausgewogenen chromatografischen Trennung mit stabilen Retentionszeiten aller untersuchten cyanobakteriellen Toxine führte. Ein bedeutsamer Nachteil der Methode war jedoch die Abnahme der Signalintensität im Laufe von umfangreichen Analysenserien. Zwar kann durch gründliches Spülen der verwendeten HPLC-Säule und häufigeres Reinigen im Q0-Bereich des Massenspektrometers dieser Tendenz entgegengewirkt werden, jedoch erscheint unter Abwägung der Vor- und Nachteile der Methode der Zusatz von TDFHA zum Eluenten nur dann sinnvoll, wenn PSP-Toxine ebenfalls im Rahmen der Screening-Methode erfasst werden sollen.

Summary

Mass occurrences of cyanobacteria are a global phenomenon, which is favoured by high temperatures, eutrophication, alkaline milieus and low to moderate salinities of brackish and limnic waters. Cyanobacteria are able to produce a broad variety of toxins, which differs in the chemical structure, the toxicological mechanism and the biological impact. Intoxications were observed in animals and humans as a result of multifaceted exposures.

(I) The present work firstly investigated the influence of modified culture media on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa* AB2005/31 and *Anabaena flos-aquae* SAG30.87. The investigation of abiotic factors included the variation of the nitrate-N ($0\text{--}247.2\text{ mg L}^{-1}$) and phosphate-P concentrations ($0.6\text{--}9.0\text{ mg L}^{-1}$) as well as the pH value ($7.5\text{--}10.5$) of the medium. The influence of biotic factors was exemplarily observed by application of 50 % spent medium of *Synechocystis* sp. SAG92.79. Furthermore, a cryopreservation method for cyanobacteria should be developed and examined due to its ability to reactivate growth and toxin production. During each experiment with duration of 6 weeks, the growth of the cyanobacterial cultures was monitored weekly by determination of the dry weight and the chlorophyll-*a* content. Toxin concentrations were analysed every two weeks by LC-MS determination. The toxin profile of *M. aeruginosa* AB2005/31 comprised 79 % of MC-RR and MC-LR in sum. In addition, the concentrations of dm-MC-RR, dm-MC-LR, LC-LA, dm-MC-LA and MC-YR were analysed during the cultivation period. It could be shown that a low phosphate-P content of 0.6 mg L^{-1} and an alkaline pH 10.5 of the medium stimulates the growth and toxin production of *M. aeruginosa* AB2005/31, whereas the nitrate experiment allows no unambiguous conclusions concerning an increase of growth and toxin production. Meanwhile, the limitation of nitrate caused a significant decrease of biomass and toxin production in *Anabaena* and *Microcystis*, respectively. Hence, an adequate nitrogen source is a precondition for the growth of cyanobacteria. Phosphate limitation leads to a clear reduction of the chlorophyll-*a* content, however the biomass production was not influenced. The decline of the pH value to 7.5 caused a decrease of both, chlorophyll-*a* content and dry weight. However, for *A. flos-aquae* SAG30.87 the general tendency of a decreasing anatoxin-*a* biosynthesis was retarded at neutral pH. Thus, a discrepancy between optimal conditions for growth and toxin production was observed. In the context of the experiment concerning the influence of biotic factors no unambiguous conclusions could be made, since the toxin concentrations of the control and the treatment were very low. This observation, which was

also reported by various authors, was subjected to a general tendency of a decreasing toxin production of cyanobacteria under cultivation conditions. In particular, *Anabaena flos-aquae* SAG30.87 was not suited for the applied experiments due to the rapid decline in toxin production. Cryopreservation of cyanobacteria is a powerful method to prevent the loss of vitality and toxin biosynthesis as well as the risk of contaminations during cultivation. After the expiration of a freeze-thaw cycle the cultures could be successfully reactivated, and particularly with regard to *Microcystis*, conservation of the microcystin production has been demonstrated. However, fast removal of the cryoprotectant is the *sine qua non* of the preservation of vitality and the ability of toxin production.

(II) A highly specific LC-MS/MS method was developed for determination of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diaminobutyric acid in cyanobacteria and plant seeds. Liquid chromatographic separation was performed by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) by application of the Luna HILIC column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) in combination with a formic acid/ammonium formate buffer (pH 3.0) in water/acetonitrile. The mass transitions m/z 119>102, 119>101, 119>88 and 119>44 were most suitable for sensitive and selective determination of both neurotoxic isomers. The comparison of the novel method with recently published LC-MS/MS methods for analysis of the underivatized amino acids demonstrated an advancement of the detection limits and the unambiguous discrimination of the neurotoxic isomers. In terms of method validation, spiked amino acids demonstrated sufficient recovery rates after sample preparation for analyses of the free and protein-bound forms, especially in the low concentration range. Numerous free living cyanobacteria and nutritional supplements based on cyanobacteria were investigated by application of this method. The neurotoxic amino acid BMAA was not detectable in any of the cyanobacterial samples. This result is in contrast with numerous reports that postulated an ubiquitous occurrence of BMAA in diverse taxa of cyanobacteria. In this context it is evident that all of these studies applied the fluorimetric or mass selective detection after derivatization of BMAA and did not take into account the determination of the neurotoxic isomer DAB as well as the discrimination of other potentially co-eluting amino acids which exhibit the same mass/charge ratio. Until now, BMAA was not detected in cyanobacteria on the basis of highly specific LC-MS/MS techniques for determination of the underivatized amino acid. However, in the present work, the occurrence of DAB was verified in some free-living cyanobacteria in concentrations of 0.07 - 0.83 $\mu\text{g g}^{-1}$. In view of these results and in terms of the risk assessment of nutritional supplements based on cyanobacteria, it can be concluded that a

possible health hazard through exposure to neurotoxic amino acids is of lower impact in relation to the widespread occurrence of hepatotoxic microcystins.

(III) Nodularins and microcystins are cyclic penta- and heptapeptides that act as inhibitors of the protein phosphatases (PP) 1 and 2A with a potential hepatotoxic effect. Together more than 100 structural variants have been reported so far. For the monitoring of drinking water and nutritional supplements only MC-LR, -RR and -YR are of legal relevance according to the norm ISO 20179. The specified method is based on HPLC-UV determination of the structural variants by comparison of the retention times as the only identification criterion. It could be shown that the application of this technique resulted in a co-elution of these MCs with the corresponding desmethylated variants. The designated aim for an adequate risk assessment was the chromatographic separation of all legal relevant MCs from their single and double desmethylated variants. This succeeded by means of stationary perfluorinated phenyl phases in combination with a mobile phase that consisted of a formic acid/ammonium formate buffer in water/acetonitrile. Furthermore, the method allows the separation of nodularin from two different desmethyl-nodularins. In particular, the HPLC column Luna PFP (Phenomenex, Torrance, CA, USA) demonstrates an outstanding stability through constant retention times over a period of more than 100 chromatographic runs. By application of this method purified MC and NOD fractions were isolated preparative to determine the exact chemical structure of the dominant desmethyl variants. For this purpose, two mass spectrometric techniques, i.e. the triple quadrupole and the ion trap mass analyzer, were compared with regard to the detection of characteristic fragment ions. In this connection, only less differences in the fragmentation patterns were observed, especially the characteristic Adda fragment at m/z 135 amu was not detectable in the ion trap due to the typical low-mass cut-off. Furthermore, a new method for the stereospecific determination of the amino acids within the peptide ring of the hepatotoxins was applied, which enables the differentiation of the isomers Mdha and Dhb at position 7. After microwave-assisted hydrolysis the resulting amino and keto acids were determined by GC-MS as their N-TFA-amino acid-OMe and PFBoxime-keto acid-OTMS derivatives, respectively. By application of different methods, the dominant desmethyl microcystins [Dha⁷]MC-RR and [Dha⁷]MC-LR were unambiguously verified in *Microcystis aeruginosa* from Lake Senftenberg (2005). Furthermore, the dominant desmethyl nodularin [Asp¹]NOD was determined in *Nodularia spumigena* from the Baltic Sea (2004).

(IV) Based on the method of Hiller et al. (2007) a screening method for the liquid chromatographic separation and mass specific detection of almost all cyanobacterial toxin groups should be optimized in terms of the retention of polar analytes (ANA, CYN, PSP). For the unambiguous identification of anatoxin-a by LC-MS/(MS) determination at m/z 166, the chromatographic separation of the neurotoxin from the proteinogenic amino acid phenylalanine is required. The examination of the fragmentation of both compounds in the course of the ionization, i.e. subject to the ion spray voltage, and of the fragmentation in the collision cell (Q2), i.e. subject to the collision energy and the collision cell exit potential, should afford the distinct identification of ANA: The highly specific mass transitions at m/z 166>43 for ANA and at m/z 166>103 and 166>120 for Phe were eminently suitable for a tandem mass spectrometric differentiation. Besides the molecular ion at m/z 166, single quadrupole analyses can utilize the characteristic ion for phenylalanine at m/z 120. Hence, a mix-up of both analytes can be prevented on the base of a multi-compound LC MS method. Furthermore, the chromatographic separation of the compounds was carried out on reversed-phase columns with stability under 100 % aqueous conditions. The HPLC column Phenomenex Aqua exhibits a well-balanced multi-compound separation including the baseline separation of ANA and Phe. Despite of a successful increase of the retention of anatoxin-a and cylindrospermopsin, the retention of the highly polar PSP toxins were deficient in the applied reversed-phase mode. In this context, the influence of tridecafluoroheptanoic acid (TDFHA), an ion pair reagent suitable for MS detection, was examined. This leads to a definite increase in retention and detection sensitivity of the PSP toxins and to a balanced chromatographic separation with stable retention times of all determined cyanobacterial toxins. However, an important disadvantage of this method is the decrease in signal intensity in the course of extensive sample analyses. Efficient flushing of the HPLC column and frequent cleaning of the Q0 unit of the mass spectrometry instrument is able to compensate this tendency. Under consideration of the assets and drawbacks of this method, the use of TDFHA is expedient only for the consideration of PSP toxins within the scope of the screening method.

7 Literatur

1. 2. Buch Mose, Kapitel 7, Vers 20-21. Die Bibel (1987). 70. Aufl., Verlag R. Brockhaus, Wuppertal.
2. Abdelrahman, S., Elayouty, Y.M., Kamael, H.A. (1993). Characterization of heptapeptide toxins extracted from *Microcystis aeruginosa* (Egyptian Isolate) - comparison with some synthesized analogs. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 41:1-7.
3. Abdulqader, G., Barsanti, L., Tredici, M. (2000). Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *Journal of Applied Phycology*. 12:493-498.
4. Abouabdellah, R., Taleb, H., Bennouna, A., Erler, K., Chafik, A., Moukrim, A. (2008). Paralytic shellfish poisoning toxin profile of mussels *Perna perna* from southern Atlantic coasts of Morocco. *Toxicon*. 51:780-786.
5. Adelman, W.J. Jr., Fohlmeister, J.F., Sasner, J.J. Jr., Ikawa, M. (1982). Sodium channels blocked by aphantoxin obtained from the blue-green alga, *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon*. 20:513-516.
6. Anadotter, H., Cronberg, G., Lawton, L., Hasson, H.-B., Göthe, U., Skulberg, O.M. (2001). A large outbreak of gastroenteritis associated with the toxic cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyceae) in Scania, South Sweden. In: Chorus I (ed) Cyanotoxins – occurrence, effects, controlling factors. *Springer-Verlag, Berlin, Germany*, pp. 200-208 .
7. Andersson, H., Lindqvist, E., Olson, L. (1997). Plant-derived amino acids increase hippocampal BDNF, NGF, c-fos and hsp70 mRNAs. *Neuroreport*. 8:1813-1817.
8. Apeldoorn, M.E.v., Egmond, H.P.v., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*. 51:7-60.
9. Armstrong, M., Jonscher, K., Reisdorph, N.A. (2007). Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 21:2717-2726.
10. Azevedo, S., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M. (1994). 1st report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*. 6:261-265.
11. Azevedo, S., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*. 181-182:441-446.
12. Bagu, J.R., Sykes, B.D., Craig, M.M., Holmes, C.F.B. (1997). A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1 - molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. *Journal of Biological Chemistry*. 272:5087-5097.
13. Baldia, S.F., Conaco, M.C.G., Nishijima, T., Imanishi, S., Harada, K.-I. (2003). Microcystin production during algal bloom occurrence in Laguna de Bay, the Philippines. *Fisheries Science*. 69:110-116.
14. Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S. (2004). Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya–Lakes Bogoria, Nakuru and Elementeita. *Journal of Plankton Research*. 26:925-935.
15. Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, W., Pflugmacher, S. (2005). Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae*. 4:139-150.
16. Banack, S.A., Cox, P.A. (2003a). Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology*. 6:387-389.
17. Banack, S.A., Cox, P.A. (2003b). Distribution of the neurotoxic non-protein amino acid BMAA in *Cycas micronesia*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 143:165-168.

18. Banack, S.A., Murch, S.J., Cox, P.A. (2006). Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *Journal of Ethnopharmacology*. 106:97-104.
19. Banack, S.A., Johnson, H.E., Cheng, R., Cox, P.A. (2007). Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Marine Drugs*. 5:180-196.
20. Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A. (1997). Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*. 33:613-616.
21. Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A. (1997). Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*. 33:613-616.
22. Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A. (2001). Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*. 62:281-288.
23. Barrett, S. (2003). Cell Tech loses false advertising suit. *Multilevel Marketing Watch*. <http://www.mlmwatch.org/04C/CT/ruling.html> (09.10.2008).
24. Bateman, K.P., Thibault, P., Douglas, D.J., White, R.L. (1995). Mass-spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using online chromatographic and electrophoretic separations. *Journal of Chromatography A*. 712:253-268.
25. Bates, H.A., Rapoport, H. (1975). Chemical assay for saxitoxin, paralytic shellfish poison. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 23:237-239.
26. Beattie, K.A., Kaya, K., Sano, T., Codd, G.A. (1998). Three dehydrobutyrine-containing microcystins from *Nostoc*. *Phytochemistry*. 47:1289-1292.
27. Beattie, K.A., Kaya, K., Codd, G.A. (2000). The cyanobacterium *Nodularia* PCC 7804, of freshwater origin, produces [L-Har²]nodularin. *Phytochemistry*. 54:57-61.
28. Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology*. 5:235-241.
29. Bell, E.A., Perera, K.P.W.C., Nunn, P.B., Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M. (1996). Non-protein amino acids of *Lathyrus latifolius* as feeding deterrents and phagostimulants in *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry*. 43:1003-1007.
30. Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarini, S., Francogli, S., Scoglio, S., Canestrari, F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences*. 75:2353-2362.
31. Bergman, B. (2002). In: Cyanobacteria in symbiosis, eds. Rai, A.N., Bergman, B. & Rasmussen, U. (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), pp. 207-232.
32. Bermejo-Bescós, P., Piñero-Estrada, E., Villar Del Fresno, A.M. (2008). Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology In Vitro*. 22:1496-1502.
33. Blom, J.F., Robinson, J.A., Jüttner F. (2001). High grazer toxicity of [D-Asp³, (E)-Dhb⁷]microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon*. 39:1923-1932.
34. Bolch, C.J.S., Blackburn, S.I. (1996). Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. *Journal of Applied Phycology*. 8:5-13.
35. Bonnett, H.T. (1990) in CRC Handbook of symbiotic cyanobacteria, eds. Rai, A.N. (CRC, Boca Raton, FL), pp. 161-171.

36. Botes, D.P., Tuinman, A.A., Wessels, P.L., Viljoen, C.C., Kruger, H., Williams, D.H., Santikarn, S., Smith, R.J., Hammond, S.J. (1984). The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*. 10:2311-2318.
37. Botes, D.P., Wessels, P.L., Kruger, H., Runnegar, M.T.C., Santikarn, S., Smith, R.J., Barna, J.C.J., Williams, D.H. (1985). Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*. 2747-2748.
38. Bouaicha, N., Maatouk, I. (2004). Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology Letters*. 148:53-63.
39. Box, J.D. (1988). Cryopreservation of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *European Journal of Phycology*. 23:385-386.
40. Brand, J., Cryopreservation of cyanobacteria:
<http://bilbo.bio.purdue.edu/www-cyanosite/protocols/cryo.html> (05.11.2008)
41. Bravo, I., Cacho, E., Franco, J.M., Miguez, A., Reyero, M.I., Martinez, A. (1996). Study of PSP toxicity in *Haliotis tuberculata* from the Galician coast. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y., (Ed.) (1996). Harmful and toxic algal blooms. *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris*. 421-424.
42. Brenner, E.D., Stevenson, D.W., McCombie, R.W., Katari, M.S., Rudd, S.A., Mayer, K.F.X., Palenchar, P.M., Runko, S.J., Twigg, R.W., Dai, G., Martienssen, R.A., Benfey, P.N., Coruzzi, G.M. (2003). Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant. *Genome Biology*. 4:R78.1-11.
43. Brient, L., Lengronne, M., Bormans, M., Fastner, J. (2008). First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. *Environmental Toxicology*. Epub ahead of print.
44. Brittain, S., Mohamed, Z.A., Wang, J., Lehmann, V.K.B., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. (2000). Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. *Toxicon*. 38:1759-1771.
45. Brownson, D., Mabry, T., Leslie, S. (2002). The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 82:159-167.
46. Brüll, L.P., Huang, Z., Thomas-Oates, J.E., Paulsen, B.S., Cohen, E.H., Michaelsen, T.E. (2000). Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*. *Journal of Phycology*. 36:871-81.
47. Bruno, M., Fiori, M., Mattei, D., Melchiorre, S., Messineo, V., Volpi, F., Bogialli, S., Nazzari, M. (2006). ELISA and LC-MS/MS methods for determining cyanobacterial toxins in blue-green algae food supplements. *Journal of Asian Natural Products Research*. 20:827-834.
48. Buenz, E.J., Howe, C.L. (2007). Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *Neurotoxicology*. 28:702-704.
49. Bumke-Vogt, C., Mailahn, W., Chorus, I., (1999). Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environmental Toxicology*. 14:117-125.
50. Bundesinstitut für Risikobewertung (2005). Maus-Bioassay als Standard-Referenzmethode für die routinemäßige Analyse von Algengiften in Muscheln nicht geeignet. Stellungnahme Nr. 032/2005 vom 26. Mai 2005.

51. Bundeszentrale für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) (2001). AFA Algen und AFA Algenprodukte. Stellungnahme vom 23.09.2001.
http://www.bfr.bund.de/cm/208/afa_algen_und_afa_algenprodukte.pdf (16.09.2008).
52. Bundeszentrale für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) (2002). BgVV und BfArM warnen: Nahrungsergänzungsmittel aus AFA-Algen können keine medizinische Therapie ersetzen. Gemeinsame Pressemitteilung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) sowie des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV). BgVV - Pressedienst 08/2002 vom 21.03.2002.
53. Byth, S. (1980). Palm Island mystery disease. *Medical Journal of Australia*. 2:40-42.
54. Carmichael, W.W., Beasley, V., Bunner, D.L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.I., Krishnamurthy, T., Yu, M.J., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O.M., Watanabe, M. (1988a). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*. 26:971-973.
55. Carmichael, W.W., Eschedor, J.T., Patterson, G.M., Moore, R.E. (1988b). Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L575 from New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:2257-2263.
56. Carmichael, W.W., Mahmood, N.A., Hyde, E.G. (1990). Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). *ACS Symposium Series*. 418:87-106.
57. Carmichael, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*. 72:445-459.
58. Carmichael, W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*. 170:78-86.
59. Carmichael, W.W., Evans, W.R., Yin, Q.Q., Bell, P., Moczydlowski, E. (1997). Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:3104-3110.
60. Carmichael, W.W., Drapeau, C., Anderson, D.M. (2000). Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* ralfs ex Born and flah. Var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *Journal of Applied Phycology*. 12:585-595.
61. Carmichael, W.W. (2001). Health effects of toxin-producing cyanobacteria, "The CyanoHabs". *Human and Ecological Risk Assessment*. 7:1393-1407.
62. Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*. 109:663-668.
63. Castro, D., Vera, D., Lagos, N., Garcia, C., Vásquez, M. (2004). The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon*. 44:483-489.
64. Chamorro, G., Salazar, S., Castillo, L., Steele, C., Salazar, M. (1997). Reproductive and peri- and postnatal evaluation of *Spirulina maxima* in mice. *Journal of Applied Phycology*. 9:107-112.
65. Charlton, T.S., Marini, A.M., Markey, S.P., Norstog, K., Duncan, M.W. (1992). Quantification of the neurotoxin 2-amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in *Cycadalea*. *Phytochemistry*. 31:3429-3432.
66. Chemisches Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Sigmaringen (2005). Lebensmittelüberwachung und Umweltschutz. Jahresbericht 2005.
http://www.cvua-sigmaringen.de/Daten/Jahresberichte/CVUA-SIG_JB_2005.pdf (12.02.2009)

67. Chemisches Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Sigmaringen (2006). Lebensmittelüberwachung und Umweltschutz. Jahresbericht 2006.
http://www.cvua-sigmaringen.de/Daten/Jahresberichte/JB_2006_SIG_kl.pdf (12.02.2009)
68. Chemisches Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Sigmaringen (2007). Lebensmittelüberwachung und Umweltschutz. Jahresbericht 2007.
http://www.cvua-sigmaringen.de/Daten/Jahresberichte/JB_2007_SIG_kl.pdf (12.02.2009)
69. Chen, Y.M., Huang, R., Chou, H.N. (2005). Application of protein phosphatase 1 inhibition assay and reversed phase liquid chromatography for the detection of microcystins in algal dietary supplements. *Journal of Food and Drug Analysis*. 13:71-77.
70. Chen, Y.M., Lee, T.H., Lee, S.J., Huang, H.B., Huang, R., Chou, H.N. (2006). Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. *Toxicon*. 47:742-746.
71. Choi, B.W. (1992). Studies on secondary metabolites produced by actinomycetes and cyanobacteria. Ph.D. Thesis, University of Illinois, Urbana.
72. Choi, B.W., Namikoshi, M., Sun, F., Rinehart, K.L., Carmichael, W.W., Kaup, A.M., Evans, W.R., Beasley, V.R. (1993). Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins nodularin and microcystins. *Tetrahedron Letters*. 34:7881-7884.
73. Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E. (2003). Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology*. 185:564-572.
74. Christiansen, G., Yoshida, W.Y., Blom, J.F., Portmann, C., Gademann, K., Hemscheidt, T., Kurmayer, R. (2008). Isolation and structure determination of two microcystins and sequence comparison of the mcyABC adenylation domains in *Planktothrix* species. *Journal of Natural Products*. 71:1881-1886.
75. Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*. 47:551-578.
76. Cohen, S.A., Michaud, D.P. (1993). Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinyl amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 211:279-287.
77. Cox, P.A., Sacks, O.W. (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology*. 58:956-959.
78. Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J. (2003). Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:13380-13383.
79. Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:5074-5078.
80. Craig, M., McCready, T.L., Luu, H.A., Smillie, M.A., Dubord, P., Holmes, C.F.B. (1993). Identification and characterization of hydrophobic microcystins in Canadian fresh water cyanobacteria. *Toxicon*. 31:1541-1549.
81. Cremer, J. and Henning, K. (1991). Application of reversed-phase medium-pressure liquid chromatography to the isolation, separation and amino acid analysis of 2 closely related peptide toxins of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain PCC7806. *Journal of Chromatography*. 587:71-80.
82. Cruz-Aguado, R., Winkler, D., Shaw, C.A. (2006). Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 84:294-299.

83. Dagnino, D., Schripsema, J. (2005). ^1H NMR quantification in very dilute toxin solutions: application to anatoxin-a analysis. *Toxicon*. 46:236-240.
84. Day, J.G. (2004). Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/ thawing and application in culture collections. *Nova Hedwigia*. 79:191-205.
85. Day, J.G. (2007). Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria. *Methods in Molecular Biology*. 368:141-151.
86. Deeds, J.R., Landsberg, J.H., Etheridge, S.M., Pitcher, G.C., Longan, S.W. (2008). Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. *Marine Drugs*. 6:308-348.
87. Dell'Aversano, C., Eaglesham, G.K., Quilliam, M.A. (2004). Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1028:155-164.
88. Dell'Aversano, C., Hess, P., Quilliam, M.A. (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A*. 1081:190-201.
89. Delpeuch F., Joseph, A., Cavelier, C. (1975). Consumption as food and nutritional composition of blue-green algae among populations in the Kanem region of Chad. *Ann. Nutr. Aliment*. 29: 497-516.
90. Demoulin, V., Janssen, M.P. (1981). Relationship between diameter of the filament and cell shape in blue-green algae. *British Phycological Journal*. 16:55-58.
91. De Rivera, C., Miranda-Zamora, R., Diaz-Zagoya, J.C., Oropeza, M. (1993). Preventive effect of *Spirulina maxima* on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat. *Life Sciences*. 53:57-61.
92. De Silva, E.D, Williams, D.E., Andersen, R.J., Klix, H., Holmes, C.F.B., Allen, T.M. (1992). Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the Papua New Guinea sponge *Theonella swinhoei* Gray. *Tetrahedron Letters*. 33:1561-1564.
93. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (2002). AFA-Algen. DGE-Info vom 01.04.2002. <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=print&sid=321> (16.09.2008).
94. Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, N.R., Pike, R.K., Stavric, B. (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44H. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*. 55:1367-1371.
95. Diehnelt, C.W., Dugan, N.R., Peterman, S.M., Budde, W.L. (2006). Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Analytical Chemistry*. 78:501-512.
96. Diener, M., Erler, K., Hiller, S., Christian, B., Luckas, B. (2006). Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. *European Food Research and Technology*. 224:147-151.
97. Diener, M., Erler, K., Christian, B., Luckas, B. (2007). Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Separation Science*. 30:1821-1826.
98. Dietrich, D., Hoeger, S. (2005). Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203:273-289.
99. Dillenberg, H.O., Dehnelt, M.K. (1960). Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Canadian Medical Association Journal*. 83:1151-1154.

100. Ding, W.X., Shen, H.M., Shen, Y., Zhu, H.G., Ong, C.N. (1998). Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*. 106:409-413.
101. Ding, W.X., Shen, H.M., Zhu, H.G., Lee, B.L., Ong, C.N. (1999). Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 442:69-77.
102. Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N. (2000). The critical role of mitochondrial Ca^{2+} and reactive oxygen species in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Hepatology*. 32:493A.
103. Dittmann, E., Wiegand, C. (2006). Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition and Food Research*. 50:7-17.
104. Dittrich, K. (2003). AFA-Algen. Das blaue Wunder? *UGB (Verband für Unabhängige Gesundheitsberatung) - Forum*. 4:212-213.
<http://www.ugb.de/zentraleElemente/pdf/02-041.pdf> (18.09.2008).
105. Dörr, F.A., Rodriguez, V., Molica, R., Henriksen, P., Krock, B., Pinto, E. (2009). Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Toxicon*. Submitted: TOXCON-D-09-00197.
106. Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C. (2001) Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*. 18:525-531.
107. Duncan, M.W., Steele, J.C., Kopin, I.J., Markey, S.P. (1990). 2-amino-3-(methylamino)- propionic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology*. 40:76-772.
108. Duy, T.N., Lam, P.K.S., Shaw, G., Connell, D.W. (2000). Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (bluegreen algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 163:113-186.
109. Eaglesham, G.K., Norris, R.L., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Davis, B.C., Neville, G.R., Seawright, A.A., Moore, M.R. (1999). Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environmental Toxicology*. 14:151-154.
110. Ecke, M. (2008). Mikroalgenproduktion im industriellen Maßstab. Betriebserfahrungen mit der 12000 m² Photobioreaktoranlage in Klötze / Deutschland. Vortrag, Hamburg, 17.01.2008.
<http://www.mstonline.de/mikrosystemtechnik/mst-fuer-energie/medien/05algomed> (16.09.2008).
111. Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M., Codd, G.A. (1992). Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*. 30:1165-1175.
112. Edwards, C., Lawton, L.A., Beattie, K.A., Codd, G.A., Pleasance, S., Dear, G.J. (1993). Analysis of microcystins from cyanobacteria by liquid chromatography with mass spectrometry using atmospheric pressure ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 7:714-721.
113. EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Marine biotoxins in shellfish - Saxitoxin group. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*. 1019:1-76.
114. Eisenbrand, G. (2008). Microcystins in algae products used as food supplements. *Molecular Nutrition and Food Research*. 52:735-736.
115. Elleman, T.C., Falconer, I.R., Jackson, A.R.B., Runnegar, M.T. (1978). Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom. *Australien Journal of Biological Sciences*. 31:209-218.

116. Engeli, B. (2005). Annex zur SKLM (Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln) - Stellungnahme „Microcystine in Algenprodukten zur Nahrungsergänzung“ vom 28. September 2005 . Übersicht und Auswertung der Literatur zu Microcystinen . Bundesamt für Gesundheit, Sektion Ernährungs- und Toxikologische Risiken, Zürich.
117. Engelke, C.J., Lawton, L.A., Jaspars, M. (2003). Elevated microcystin and nodularin levels in cyanobacteria growing in spent medium of *Planktothrix agardhii*. *Archiv für Hydrobiologie*. 158:541-550.
118. Erhard, M., von Döhren, H., Jungblut, P. (2001). Rapid typing and structure determination of cyanobacterial peptides using MALDI-TOF mass spectrometry. 344-353. In: Chorus, I. (ED.) (2001). Cyanotoxins. Occurrence, causes, consequences. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. ISBN 3-540-64999-9.
119. Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A.O., Kujari, H.P., Österlund, K., Fagerlund, K., Hällbom, L., 1988. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon*. 26:161-166.
120. Eriksson, J.E., Toivola, D., Meriluoto, J.A.O., Codd, G.A., Kass, G.E.N., Karaki, J., Han, Y. G., Hartshorne, D. (1990). Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 173:1347-1353.
121. Eriksson, J., Jonasson, S., Papaefthimiou, D., Rasmussen, U., Bergman, B. (2009) Improving derivatization efficiency of BMAA utilizing AccQ-Tag in a complex cyanobacterial matrix. *Amino Acids*. 36:43-48.
122. Esterhuizen, M., Downing, T.G. (2008). β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71:309-313.
123. Falconer, I.R., Beresford, A.M., Runnegar, M.T.C. (1983). Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Medical Journal of Australia*. 1:511-514.
124. Falconer, I.R., Humpage, A.R. (2001). Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*. 16:192-195.
125. Farrar, W.V. (1966). Tecuitlatl: A glimpse of Aztec food technology. *Nature*. 211:341-342.
126. Fawell, J. K., James, C. P., and James, H. A. (1994). Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. *Foundation for Water Research, Marlow, Bucks, England*.
127. Ferreira, F.M., Franco Soler, J.M., Fidalgo, M.L., Fernández-Vila, P. (2001). PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon*. 39:757-761.
128. Fiedler, F., Kandler, O. (1973). Die Aminosäuresequenz von 2,4-Diaminobuttersäure enthaltenden Mureinen bei verschiedenen coryneformen Bakterien und *Agromyces ramosus*. *Archiv für Mikrobiologie*. 89:51-66.
129. Fikre, A., Korbu, L., Kuo, Y.-H., Lambein, F. (2008). The contents of the neuro-excitatory amino acid β -ODAP (β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid), and other free and protein amino acids in the seeds of different genotypes of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Food Chemistry*. 110:422-427.
130. Francis, G. (1878). Poisonous Australian lake. *Nature*. 18:11-12.
131. Frias, H.V., Mendes, M.A., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Tomazela, D., Colepicolo, P., Pinto, E. (2006). Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 344:741-746.

132. Fritsche, W. (2002). Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin.
133. Froscio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R. (2003). Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology*. 18:243-251.
134. Furey, A., Crowley, J., Lehane, M., James, K.J. (2003a). Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17:583-588.
135. Furey, A., Crowley, J., Shuilleabhain, A.N., Skulberg, O.M., James, K.J. (2003b). The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Ireland. *Toxicon*. 41:297-303.
136. Furey, A., Crowley, J., Hamilton, B., Lehane, M., James, K.J. (2005). Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *Journal of Chromatography A*. 1082:91-97.
137. Furey, A., Allis, O., Ortea, P.M., Lehane, M., James, K.J. (2008). Hepatotoxins: Context and chemical determination. In: Botana, L.M. (Ed.). *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection*. Second Edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. pp. 845-886.
138. Gallon, J.R., Ul-Haque, M.I., Chaplin, A.E. (1978). Fluoroacetate metabolism in *Gloeocapsa* sp. LB795 and its relationship to acetylene reduction (nitrogen fixation). *Journal of General Microbiology*. 106:329-336.
139. Gallon, J.R., Chit, K.N., Brown, E.G. (1990). Biosynthesis of the tropane-related cyanobacterial toxin anatoxin-a: role of ornithine decarboxylase. *Phytochemistry*. 29:1107-1111.
140. Gallon, J.R., Kittakoop, P., Brown, E.G. (1994). Biosynthesis of anatoxin-a by *Anabaena flos-aquae*: Examination of primary enzymic steps. *Phytochemistry*. 35:1195-1203.
141. Gao, K. (1998). Chinese studies on the edible blue-green algae *Nostoc flagelliforme*: a review. *Journal of Applied Phycology*. 10:37-49.
142. Gathercole, P.S. and Thiel, P.G. (1987). Liquid chromatographic determination of the cyanoginosins, toxins produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Chromatography*. 408:435-440.
143. Gilroy, D.J., Kauffman, K.W., Hall, R.A., Huang, X., Chu, F.S. (2000). Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environmental Health Perspectives*. 108:435-439.
144. Gkelis, S., Moustaka-Gouni, M., Sivonen, K., Lanaras, T. (2005). First report of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* Forti in two Greek lakes and cyanotoxin occurrence. *Journal of Plankton Research*. 27:1295-1300.
145. Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C., Kuriyan, J. (1995). 3-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*. 376:745-753.
146. Grach-Pogrebinsky, O., Sedmak, B., Carmeli, S. (2004). *Seco*[D-Asp³]microcystin-RR and [D-Asp³,D-Glu(OMe)⁶]microcystin-RR, two new microcystins from a toxic water bloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Journal of Natural Products*. 67:337-342.
147. Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.C., Humbert, J.F., Guette, C., Bernard, C. (2005). First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon*. 45:919-928.
148. Gussmann, H.J., Molzahn, J., Bicks, B. (1985). Poisoning of young cattle by *Nodularia spumigena*. *Monatshefte für Veterinarmedizin*. 40:76-79.

149. Hall, S., Reichardt, P.B. (1984). Cryptic paralytic shellfish toxins. *ACS Symposium Series*. 262:113-123.
150. Hållbom, L. (1984). Sarcosine: a possible regulatory compound in the *Peltigera praetextata*-*Nostoc* symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*. 22:119-121.
151. Harada, K., Kimura, Y., Ogawa, K., Suzuki, M., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W. (1989). A new procedure for the analysis and purification of naturally-occurring anatoxin-a from the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*. 27:1289-1296.
152. Harada, K., Matsuura, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W. (1990). Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins-LR and -RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon*. 28:55-64.
153. Harada, K., Ogawa, K., Matsuura, K., Nagai, H., Murata, H., Suzuki, M., Itezono, Y., Nakayama, N., Shirai, M., Nakano, M. (1991a). Isolation of 2 toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon*. 29:479-489.
154. Harada, K., Ogawa, K., Kimura, Y., Murata, H., Suzuki, M., Thorn, P., Evans, W.R., Carmichael, W.W. (1991b). Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chemical Research in Toxicology*. 4:535-540.
155. Harada, K., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Terao, K. (1994). Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*. 32:73-84.
156. Hart, A.N., Zaske, L.A., Patterson, K.M., Drapeau, C., Jensen, G.S. (2007). Natural killer cell activation and modulation of chemokine receptor profile in vitro by an extract from the cyanophyta *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Medicinal Food*. 10:435-41.
157. Hawser, S.P., Codd, G.A., Capone, D.G., Carpenter, E.J. (1991). A neurotoxic factor associated with bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. *Toxicon*. 29:277-278.
158. Hayashi, O., Katoh, T., Okuwaki, Y. (1994). Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 40:431-441.
159. Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R. (1985). Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water-supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*. 50:1292-1295.
160. Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J.S., Moestrup, O. (1997). Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon*. 35:901-913.
161. Hermansky, S.J., Stohs, S.J., Eldeen, Z.M., Roche, V.F., Mereish, K.A. (1991). Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *Journal of Applied Toxicology*. 11:65-73.
162. Hiller, S. (2007). Entwicklung und Anwendung von Analysenverfahren zur Erfassung cyanobakterieller Toxine basierend auf flüssigkeitschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion. Dissertation an der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
163. Hiller, S., Krock, B., Cembella, A., Luckas, B. (2007). Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 42:1238-1250.
164. Hindman, S.H., Favero, M.S., Carson, L.A., Petersen, N.J., Schonberger, L.B., Solano, J.T. (1975). Pyrogenic reactions during haemodialysis caused by extramural endotoxin. *Lancet*. 2:732-734.

165. Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 12:435-439.
166. Hoeger, S.J. (2003). Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health. Dissertation an der Universität Konstanz.
167. Hoeger, S.J., Schmid, D., Blom, J.F., Ernst, B., Dietrich, D.R. (2007). Analytical and functional characterization of microcystins [Asp³]MC-RR and [Asp³, Dhb⁷]MC-RR: Consequences for risk assessment? *Environmental Science and Technology*. 41:2609-2616.
168. Holmes, C.F.B., Boland, M.P. (1993). Inhibitors of protein phosphatase-1 and -2A; two of the major serine/threonine protein phosphatases involved in cellular regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 3:934-943.
169. Honkanen, R.E., Zwiller, J., Moore, R.E., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M., Boynton, A.L. (1990). Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*. 265:19401-19404.
170. Hormazabal, V., Ostensvik, O., Underdal, B., Skulberg, O.M. (2000). Simultaneous determination of the cyanotoxins anatoxin A, microcystin desmethyl-3-RR, LR, RR and YR in water using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 23:3155-3164.
171. Hosoyamada, Y., Takai, T., Kato, T. (1991). Effects of water-soluble and insoluble fractions of *Spirulina* on serum lipid components and glucose tolerance in rats. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*. 44:273-277.
172. Hughes, E.O., Gorham, P.R., Zehnder, A. (1958). Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*. 4:225-236.
173. Humpage, A.R., Rositano, J., Bretag, A.H., Brown, R., Baker, P.D., Nicholson, B.C., Steffensen, D.A. (1994). Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 45:761-771.
174. Humpage, A.R., Hardy, S.J., Moore, E.J., Froscio, S.M., Falconer, I.R. (2000). Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*. 61:155-165.
175. Humpage, A.R., Falconer, I.R. (2003). Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology*. 18:94-103.
176. Humpage, A.R., Fontaine, F., Froscio, S., Burcham, P., Falconer, I.R. (2005). Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part a - Current Issues*. 68:739-753.
177. Ince, P.G., Codd, G.A. (2005) Return of the cycad hypothesis – does the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam have new implications for global health? *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 31:345–353.
178. Ishii, K., Katoh, T., Okuwaki, Y., Hayashi, O. (1999). Influence of dietary *Spirulina platensis* on IgA level in human saliva. *Journal of Kagawa Nutrition University*. 30:27-33.
179. Ismail, N., Becker, B.N., Hakim, R.M. (1996). Water treatment for hemodialysis. *American Journal of Nephrology*. 16:60-72.
180. ISO 20179 (2005). “Water quality Determination of microcystins - method by solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection”. ISO, Geneva, Switzerland.

181. Ito, E., Kondo, F., Harada, K. (2000). First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon*. 38:37-48.
182. Iversen, L.L., Kelly, J.S. (1975). Uptake and metabolism of γ -aminobutyric acid by neurones and glial cells. *Biochemical Pharmacology*. 24:933-938.
183. Iwasa, M., Yamamoto, M., Tanaka, Y., Kaito, M., Adachi, Y. (2002). Spirulina-associated hepatotoxicity. *The American Journal of Gastroenterology*. 97:3212-3213.
184. Jackim, E., Gentile, J. (1968). Toxins of a blue-green alga: similarity to saxitoxin. *Science*. 162:915-916.
185. Jaime, E., Hummert, C., Hess, P., Luckas, B. (2001). Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 929:43-49.
186. Jakobi, C., Rinehart, K.L., Codd, G.A., Carmienke, I., Weckesser, J. (1996). Occurrence of toxic water blooms containing microcystins in a German lake over a three year period. *Systematic and Applied Microbiology*. 19:249-254.
187. James, K.J., Sherlock, I.R., Stack, M.A. (1997). Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicon*. 35:963-971.
188. James, K.J., Crowley, J., Hamilton, B., Lehane, M., Skulberg, O., Furey, A. (2005). Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 19:1167-1175.
189. Jang, M.H., Ha, K., Joo, G.J., Takamura, N. (2003). Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*. 48:1540-1550.
190. Jang, M.H., Ha, K., Takamura, N. (2007). Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon*. 49:727-733.
191. Jiang, Y., Xie, P., Chen, J., Liang, G. (2008). Detection of the hepatotoxic microcystins in 36 kinds of cyanobacteria *Spirulina* food products in China. *Food Additives and Contaminants*. 25:885-894.
192. Jensen, G., Ginsberg, D., Drapeau, C. (2001). Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *Journal of the American Nutraceutical Association*. 3:24-30.
193. Jespersen, A.M., Christoffersen, K. (1987). Measurements of chlorophyll-*a* from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Archiv für Hydrobiologie*. 109:445-454.
194. Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.D., de Melo, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S.T., Azevedo, S., Jarvis, W.R. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*. 338:873-878.
195. Johnson, H.E., King, S.R., Banack, S.A., Webster, C., Callanaupa, W.J., Cox, P.A. (2008). Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *Journal of Ethnopharmacology*. 118:159-165.
196. Jos, A., Pichardo, S., Prieto, A.I., Repetto, G., Vazquez, C.M., Moreno, I., Camean, A.M. (2005). Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*. 72:261-271.
197. Kaebernick, M., Neilan, B.A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*. 35:1-9.
198. Kaebernick, M., Dittmann, E., Borner, T., and Neilan, B.A. (2002). Multiple alternate transcripts direct

- the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Applied Environmental Microbiology*. 68:449-455.
199. Kalbe, L., Tiess, D. (1964). Entenmassensterben durch *Nodularia* - Wasserblüte am Kleinen Jasmunder Bodden auf Rügen. *Archiv für Experimentelle Veterinarmedizin*. 18:535-555.
200. Karamyan, V.T., Speth, R.C. (2008). Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. *Life Sciences*. 82:233-246.
201. Karlsson, K., Sipia, V., Kankaanpää, H., Meriluoto, J. (2003). Mass spectrometric detection of nodularin and desmethylnodularin in mussels and flounders. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 784:243-253.
202. Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., Oefner, P.J. (2008). Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids. *Journal of Chromatography B*. 870:222-232.
203. Kato, T., Takemoto, K., Katayama, H., Kuwabara, Y. (1984). Effects of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) on dietary hypercholesterolemia in rats. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*. 37:323-332.
204. Kautek, L., Chorus, I., Deuckert, I. (1993). Erkrankungen nach dem Baden in Berlin und Umland 1991/1992. *Bundesgesundheitsblatt*. 36:405-409.
205. Kaya, K., Watanabe, M.M. (1990). Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing waterblooms in Japanese freshwaters *Journal of Applied Phycology*. 2:173-178.
206. Kaya, K., Mahakhan, A., Keovara, L. (2000). Microcystin-AW, a new microcystin variant isolated from cyanobacterial waterblooms in Thailand. 9th International Conference on Harmful Algae Blooms, Hobart. 9:582-583.
207. Kearns, K.D., Hunter, M.D. (2000). Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environmental Microbiology*. 2:291-297.
208. Keil, C., Forchert, A., Fastner, J., Szewzyk, U., Rotard, W., Chorus, I., Krätke, R. (2002). Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. *Water Research*. 36:2133-2139.
209. Kim, W.Y., Park, J.Y. (2003). The effects of spirulina on lipid metabolism, antioxidant capacity and immune function in Korean elderly. *Korean Journal of Nutrition*. 36:287-297.
210. Kirschbaum, J., Luckas, B., Beinert, W.D. (1994). Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. *Journal of Chromatography A*. 661:193-199.
211. Kisby, G.E., Roy, D.N., Spencer, P.S. (1988). Determination of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in plant (*Cycas circinalis* L.) and animal tissue by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc) and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Neuroscience Methods*. 26:45-54.
212. Kiviranta, J., Namikoshi, M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. (1992). Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. *Toxicon*. 30:1093-1098.
213. Krishnamurthy, T., Szafraniec, L., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Yates, J.R., Hauer, C.R., Carmichael, W.W., Skulberg, O., Codd, G.A., Missler, S. (1989). Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:770-774.

214. Kubo, T., Kato, N., Hosoya, K., Kaya, K. (2008). Effective determination method for a cyanobacterial neurotoxin, b-N-methylamino-L-alanine. *Toxicon*. 51:1264-1268.
215. Kuriakose, G.C., Kurup, M.G. (2008). Evaluation of renoprotective effects of *Aphanizomenon flos-aquae* on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Renal Failure*. 30:717-725.
216. Kurland, L.T. (1972). An appraisal of the neurotoxicity of cycad and the etiology of amotrophic lateral sclerosis on Guam. *Federation Proceedings*. 31:1540-1543.
217. Kusama-Eguchi, K., Suda, A., Ikegami, F., Kusama, T., Ogawa, Y., Watanabe, K. (2006). Neurotoxicity and pharmacology of *Lathyrus sativus* extracts of high- and low-toxicity strains. *Journal of Natural Medicines*. 60:107-112.
218. Kusumi, T., Ooi, T., Watanabe, M.M., Takahashi, H., Kakisawa, H. (1987). Cyanoviridin-RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis viridis*. *Tetrahedron Letters*. 28:4695-4698.
219. Kuzmina, J. (2004). Progress report on cryopreservation at the University of Toronto culture collection of algae and cyanobacteria. *Department of Botany, University of Toronto, Canada*.
<http://www.botany.utoronto.ca/utcc/CryoRepNov04%20%20received%20Jan%203%2005.pdf>
(05.11.2008)
220. Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S., Oshima, Y. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*. 37:1359-1373.
221. Lawrence, J.F., Menard, C. (1991). Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 74:1006-1012.
222. Lawrence, J.F., Wong, B., Ménard, C. (1996). Determination of decarbamoyl saxitoxin and its analogues in shellfish by prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC (Association of Analytical Communities) International*. 79:1111-1115.
223. Lawrence, J.F., Niedzwiadek, B., Menard, C., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Kuper-Goodman, T., Carbone, S., Holmes, C. (2001). Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. *Journal of AOAC (Association of Analytical Communities) International*. 84:1035-1044.
224. Lawrence, J.F., Niedzwiadek, B., Menard, C. (2005). Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. 88:1714-1732.
225. Lawton, L.A., Edwards, C., Codd, G.A. (1994). Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*. 119:1525-1530.
226. Lechno-Yossef, S. & Nierzwicki-Bauer, S. A. (2002). In: Cyanobacteria in symbiosis, eds. Rai, A. N., Bergman, B. & Rasmussen, U. (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), pp. 153-178.
227. Lee, T.-H., Chen, Y.-M., Chou, H.-N. (1998). First report of microcystins in Taiwan. *Toxicon*. 36:247-255.
228. Lee, T.-H., Chou, H.-N. (2000). Isolation and identification of seven microcystins from a cultured M. TN-2 strain of *Microcystis aeruginosa*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 41:197-202.
229. Lehtimäki, J. (2000). Characterisation of cyanobacterial strains originating from Baltic Sea with emphasis on *Nodularia* and its toxin, nodularin. *Academic dissertation in microbiology*, Helsinki 2000.

230. Li, R.H., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y.D., Watanabe, M.M. (2001a). First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*. 37:1121-1126.
231. Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, W., Kaya, K., Watanabe, M.M. (2001b). Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*. 39:973-980.
232. Lin Lin, J., Chu, F.S. (1994). Kinetics of distribution of microcystin-LR in serum and liver cytosol of mice: an immunochemical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42:1035-1040.
233. Liu, Y., Chen, W., Li, D., Shen, Y., Liu, Y., Song, L. (2006a). Analysis of paralytic shellfish toxins in *Aphanizomenon* DC-1 from Lake Dianchi, China. *Environmental Toxicology*. 21:289-295.
234. Liu, Y., Chen, W., Li, D., Shen, Y., Li, G., Liu, Y. (2006b). First report of aphanotoxins in China-waterblooms of toxigenic *Aphanizomenon flos-aquae* in Lake Dianchi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 65:84-92.
235. Llewellyn, L., Negri, A., Quilliam, M. (2004). High affinity for the rat brain sodium channel of newly discovered hydroxybenzoate saxitoxin analogues from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon*. 43:101-104.
236. Lobner, D., Piana, P.M., Salous, A.K., Peoples, R.W. (2007). Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiology of Disease*. 25:360-366.
237. Loconte, H., Stevenson, D.W. (1990). Cladistics of the spermatophyta. *Brittonia*. 42:197-211.
238. Luckas, B. (1992). Phycotoxins in seafood - toxicological and chromatographic aspects. *Journal of Chromatography*. 624:439-456.
239. Luckas, B., Hummert, C., Oshima, Y. (2003). Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In: Hallegraeff, G.M., Cembella, A.D. (Ed.) (2003). Manual on harmful marine microalgae. *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris*. 191-209.
240. Ludolph, A., Hugon, J., Nunn, P.B., Roy, D.N., Spencer, P.S. (1988). Clinical and electrophysiological features of the primate motor system disease induced by BMAA-A neurotoxin in the Guam cycad plant. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 69:P18.
241. Lukac, M., Aegerter, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*. 31:293-305.
242. Luukkainen, R., Sivonen, K., Namikoshi, M., Fardig, M., Rinehart, K.L., Niemela, S.I. (1993). Isolation and identification of 8 microcystins from 13 *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:2204-2209.
243. Luukkainen, R., Namikoshi, M., Sivonen, K., Rinehart, K.L., Niemela, S.I. (1994). Isolation and identification of 12 microcystins from 4 strains and 2 bloom samples of *Microcystis spp.* - structure of a new hepatotoxin. *Toxicon*. 32:133-139.
244. Lyck, S., Gjølme, N., Utkilen, H. (1996) Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (*Chroococcales*, *Cyanophyceae*). *Phycologia*. 35:120-124.
245. MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*. 264:187-192.
246. MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T.W., Cohen, P., MacKintosh, C. (1995). The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase-1. *FEBS Letters*. 371:236-240.

247. Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2006). Brock Mikrobiologie. Pearson Studium, 11., überarbeitete Auflage, München.
248. Magalhaes, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliveira, A.C., Costa, S.M., Azevedo, L.O., Azevedo, S. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*. 42:289-295.
249. Mahakhan, A., Sano, T., Ratanachot, P., Tong-a-ram, T., Srivastava, V.C., Watanabe, M.M., Kaya, K. (1998). Detection of microcystins from cyanobacterial water blooms in Thailand fresh water. *Phycological Research*. 46:25-29.
250. Mahmood, N.A., Carmichael, W.W. (1986). Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon*. 24:175-186.
251. Mahmood, N.A., Carmichael, W.W. (1987). Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* Nrc-525-17. *Toxicon*. 25:1221- 1227.
252. Mani, U.V., Desai, S., Iyer, U.M. (2000). Studies on the long-term effect of *Spirulina* supplementation on serum lipid profile and glycated proteins in NIDDM patients. *Journal of Nutraceuticals Functional and Medical Foods*. 2:25-32.
253. Manoukian, R., Citton, M., Huerta, P., Rhode, B., Drapeau, C., and Jensen, G. S. (1998). Effects of the blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralps on human natural killer cells. In *Phytoceuticals: Examining the health benefits and pharmaceutical properties of natural antioxidants and phytochemicals. IBC Library Series*, 1911, pp. 233-241.
254. Mao, T.K., van de Water, J., Gershwin, M.E. (2000). Effect of *Spirulina* on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medicinal Food*. 3:135-140.
255. Martin-Luna, B., Hernandez, J.A., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L. (2006a). Identification of a ferric uptake regulator from *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *FEMS Microbiology Letters*. 254:63-70.
256. Martin-Luna, B., Sevilla, E., Hernandez, J.A., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L. (2006b). Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry*. 67:876-881.
257. Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P., Carmichael, W.W. (1989). Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *Journal of the American Chemical Society*. 111:8021-8023.
258. Matthiensen, A., Beattie, K.A., Yunes, J.S., Kaya, K., Codd, G.A. (2000). [D-Leu(1)]Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry*. 55:383-387.
259. Mayumi, T., Kato, H., Imanishi, S., Kawasaki, Y., Hasegawa, M., Harada, K.-I. (2006). Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions. *The Journal Of Antibiotics*. 59:710-719.
260. Mazokopakis, E.E., Karefilakis, C.M., Tsartsalis, A.N. , Milkas, A.N., Ganotakis, E.S. (2008). Acute rhabdomyolysis caused by *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). *Phytomedicine*. 15:525-527.
261. Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Plinski, M., Szafrank, J. (2006). Characterization of nodularin variants in *Nodularia spumigena* from the Baltic Sea using liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20:2023-2032.
262. McElhiney, J., Lawton L.A. (2005). Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203:219-230.
263. McGowan, S., Britton, G., Haworth, E., Moss, B. (1999). Ancient blue-green blooms. *Limnology and Oceanography*. 44:436-439.

264. Mereish, K.A. and Solow, R. (1990). Effect of antihepatotoxic agents against microcystin-LR toxicity in cultured rat hepatocytes. *Pharmaceutical Research*. 7:256-259.
265. Mereish, K.A., Bunner, D.L., Ragland, D.R., Creasia, D.A. (1991). Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by Silymarin: Biochemistry, histopathology, and lethality. *Pharmaceutical Research*. 8:273-277.
266. Meriluoto, J.A.O., Sandstrom, A., Eriksson, J.E., Remaud, G., Craig, A.G., Chattopadhyaya, J. (1989). Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon*. 27:1021-1034.
267. Meriluoto, J.A.O., Isaksson, K., Soini, H., Nygård, S.E., Eriksson, J.E. (1990). Retention mechanisms and selectivity in internal-surface reversed-phase liquid chromatography. Studies with cyanobacterial peptide toxins. *Chromatographia* 30:301-308.
268. Meriluoto, J., Karlsson, K., Spoof, L. (2004). High-throughput screening of ten microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Chromatographia*. 59:291-298.
269. Metcalf, J.S., Banack, S.A., Lindsay, J., Morrison, L.F., Cox, P.A., Codd, G.A. (2008). Co-occurrence of b-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environmental Microbiology*. 10:702-708.
270. Miranda, M.S., Cintra, R., Barros, S.B.M., Mancini-Filho, J. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31: 1075-1079.
271. Moffitt, M.C., Neilan B.A. (2004). Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:6353-6362.
272. Molica, R., Onodera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S., Lagos, N. (2002). Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*. 41:606-611.
273. Monson, C.S., Banack, S.A., Cox, P.A. (2003). Conservation implications of Chamorro consumption of flying foxes as a possible cause of ALS-PDC in Guam. *Conservation Biology*. 17:678-686.
274. Montine, T.J., Li, K., Perl, D.P., Galasko, D. (2005). Lack of b-methylamino-L-alanine in brain from controls, AD and Chamorros with PDC. *Neurology*. 65:768-769.
275. Morena, I., Pichardo, S., Jos, A., Gomez-Amores, L., Mate, A., Vazquez, C.M., Camean, A.M. (2005). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon*. 45:395-402.
276. Moura, S., Pinto, E. (2007). One-pot synthesis of N-Cbz-L-BMAA and derivatives from N- Cbz-L-serine. *Tetrahedron Letters*. 48:2325–2327.
277. Moura, S., de Almeida Ultramari, M., de Paula, D.M.L., Yonamine, M., Pinto, E. (2009). ¹H NMR determination of β-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) in environmental and biological samples. *Toxicon*. 53:578-583.
278. Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A. (2004a). A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:12228-12231.
279. Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., Sacks, O.W. (2004b). Occurrence of β- methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurologica Scandinavica*. 110:267-269.

280. Mussagya, A., Annadotter, H., Cronberg, G. (2006). An experimental study of toxin production in *Arthrospira fusiformis* (Cyanophyceae) isolated from African waters. *Toxicon*. 48:1027-1034.
281. Myers, T.G., Nelson, S.D. (1990). Neuroactive carbamate adducts of β -N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. *The Journal of Biological Chemistry*. 265:10193-10195.
282. Nagaoka, S., Shimizu, K., Kaneko, H., Shibayama, F., Morikawa, K., Kanamaru, Y., Otsuka, A., Hirahashi, T., Kato, T. (2005). A novel protein C-phycoerythrin plays a role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *Journal of Nutrition*. 135:2425-2430.
283. Nakaya, N., Homma, Y., Goto, Y. (1988). Cholesterol lowering effect of *Spirulina*. *Nutrition Reports International*. 37:1329-1337.
284. Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Sakai, R., Sivonen, K., Carmichael, W.W. (1990). Structures of 3 new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc* sp. strain 152. *Journal of Organic Chemistry*. 55:6135-6139.
285. Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Sakai, R., Stotts, R.R., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W., Evans, W.R. (1992a). Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii* - 9 new microcystins. *Journal of Organic Chemistry*. 57:866-872.
286. Namikoshi, M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Sun, F., Rouhiainen, L., Luukkainen, R., Rinehart, K.L. (1992b). 2 New L-serine variants of microcystins-LR and microcystins-RR from *Anabaena* sp. strains 202-A1 and 202-A2. *Toxicon*. 30:1457-1464.
287. Namikoshi, M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rouhiainen, L., Luukkainen, R., Rinehart, K.L. (1992c). Structures of three new homotyrosine-containing microcystins and a new homophenylalanine variant from *Anabaena* sp. strain 66. *Chemical Research in Toxicology*. 5:661-666.
288. Namikoshi, M., Sivonen, K., Evans, W.R., Sun, F., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. (1992d). Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland). *Toxicon*. 30:1473-1479.
289. Namikoshi, M., Choi, B.W., Sun, F., Rinehart, K.L., Evans, W.R., Carmichael, W.W. (1993). Chemical characterization and toxicity of dihydro derivatives of nodularin and microcystin-LR, potent cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins. *Chemical Research in Toxicology*. 6:151-158.
290. Namikoshi, M., Choi, B.W., Sakai, R., Sun, F., Rinehart, K.L., Carmichael, W.W., Evans, W.R., Cruz, P., Munro, M.H.G., Blunt, J.W. (1994). New nodularins: a general method for structure assignment. *Journal of Organic Chemistry*. 59:2349-2357.
291. Namikoshi, M., Yuan, M., Sivonen, K., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., Rouhiainen, L., Sun, F., Brittain, S., Otsuki, A. (1998). Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units, isolated from *Anabaena* sp. strain 186. *Chemical Research in Toxicology*. 11:143-149.
292. Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H., Oishi, S. (2003). Simultaneous production of homoanatoxin-a, antitoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon*. 42:533-538.
293. Namikoshi, M., Murakami, T., Fujiwara, T., Nagai, H., Niki, T., Harigaya, E., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S. (2004). Biosynthesis and transformation of homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structures of three new homologues. *Chemical Research in Toxicology*. 17:1692-1696.
294. Negri, A.P., Jones, G.J. (1995). Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the fresh water mussel *Alathyria condola*. *Toxicon*. 33:667-678.
295. Negri, A., Stirling, D., Quilliam, M., Blackburn, S., Bolch, C., Burton, I., Eaglesham, G., Thomas, K., Walter, J., Willis, R. (2003). Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chemical Research in Toxicology*. 16:1029-1033.

296. Nishiwaki-Matsushima, R., Nishiwaki, S., Ohta, T., Yoshizawa, S., Suganuma, M., Harada, K., Watanabe, M.F., Fujiki, H. (1991). Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Japanese Journal of Cancer Research*. 82:993-996.
297. Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., Fujiki, H. (1992). Liver-tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 118:420-424.
298. Nishizawa, T., Ueda, A., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Ochi, K., Shirai, M. (2000). Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *Journal of Biochemistry* (Tokyo). 127:779-789.
299. Nishizawa, T., Asayama, M., Shirai, M. (2001). Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. *Microbiology*. 147:1235-1241.
300. Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A., Moore, M.R. (1999). Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*. 14:163-165.
301. Nunn, P.B., O'Brien, P. (1989). The interaction of beta-N-methylamino-L-alanine with bicarbonate: an ¹H-NMR study. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*. 251:31-35.
302. Oh, H.M., Lee, S.J., Jang, M.H., Yoon, B.D. (2000). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:176-179.
303. Ohta, T., Nishiwaki, R., Yatsunami, J., Komori, A., Suganuma, M., and Fujiki, H. (1992). Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*. 13:2443-2447.
304. Ohta, T., Sueoka, E., Iida, N., Komori, A., Suganuma, M., Nishiwaki, R., Tatematsu, M., Kim, S.J., Carmichael, W.W., Fujiki, H. (1994). Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2a, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Research*. 54:6402-6406.
305. Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. (1992). Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green algae *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*. 114:7941-7942.
306. Olaizola, M (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. 20:459-466.
307. O'Neal, R.M., Chen, C.-H., Reynolds, C.S., Meghal, S.K., Koeppe, R.E. (1968). The 'neurotoxicity' of L-2,4-diaminobutyric acid. *Biochemical Journal*. 106:699-706.
308. Onodera, H., Oshima, Y., Henriksen, P., Yasumoto, T. (1997a). Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon*. 35:1645-1648.
309. Onodera, H., Satake, M., Yasumoto, T., Carmichael, W. (1997b). New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Natural Toxins*. 5:146-151.
310. Onslow, H. (1921). On the stability of tryptophan in Baryta Hydrolysis. *The Biochemical Journal*. 15:383-91.
311. Ortelli, D., Edder, P., Cognard, E., Jan, P. (2008). Fast screening and quantitation of microcystins in microalgae dietary supplement products and water by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 617:230-237.

312. Oshima, Y., Sugino, K., Itakuras, H., Hirota, M., Yasumoto, T. (1990). Comparative studies of paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Graneu, R., Sunostrom, B., Eoler, L., Anderson, D.M. (Ed.) (1990). Toxic marine phytoplankton. *Elsevier, Amsterdam*. 391-396.
313. Oshima, Y., Blackburn, S.I., Hallegraeff, G.M. (1993). Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Marine Biology*. 116:471-476.
314. Papapetropoulos, S. (2007). Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochemistry International*. 50:998-1003.
315. Parikh, P., Mani, U., Iyer, U.M. (2001). Role of *Spirulina* in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medicinal Food*. 4:193-199.
316. Park, H.-D., Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M., Hayashi, H. (1993). Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Natural Toxins*. 1:353-360.
317. Park, H.J., Lee, Y.J., Ryu, H.K., Kim, M.H., Chung, H.W., Kim, W.Y. (2008). A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of *Spirulina* in elderly Koreans. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 52:322-328.
318. Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., Neilan, B.A. (2004). Inactivation of an ABC Transporter Gene, *mcyH*, Results in Loss of Microcystin Production in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:6370-6378.
319. Pereira, P., Onodera H, Andrinolo D, Franca S, Araújo F, Lagos N, Oshima Y. (2000). Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*. 38:1689-1702.
320. Pereira, P., Li, R.H., Carmichael, W.W., Dias, E., Franca, S. (2004). Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *European Journal of Phycology*. 39:361-368.
321. Pilbeam, D.J., Bell, E.A. (1979). Free amino acids in *Crotalaria* seeds. *Phytochemistry*. 18:973-985.
322. Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. (1998). Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1425:527-533.
323. Pinero Estrada, J.E., Bermejo Descos, P., Villar dell Fresno, A.M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* extract. *Farmaco*. 56:497-500.
324. Polsky, F.I., Nunn, P.B., Bell, E.A. (1972). Distribution and toxicity of α -amino- β -methylaminopropionic acid. *Federation Proceedings*. 31:1473-1475.
325. Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C., Giovannardi, S., Onodera, H., Oshima, Y., Neilan, B.A. (2000). The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology*. 36:553-562.
326. Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A. (2004). Interactions between intracellular Na^+ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology*. 150:455-461.
327. Poon, G.K., Griggs, L.J., Edwards, C., Beattie, K.A., Codd, G.A. (1993). Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry of cyanobacterial toxins. *Journal of Chromatography*. 628:215-233.

328. Preußel, K., Stuken, A., Wiedner, C., Chorus, I., Fastner, J. (2006). First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*. 47:156-162.
329. Pugh, N., Pasco, D.S. (2001). Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of *Aphanizomenon flos-aquae*. *Phytomedicine*. 8:445-453.
330. Pugh, N., Ross, S.A., El Sohly, H.N., El Sohly, M.A., Pasco, D.S. (2001). Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Medica*. 67:737-42.
331. Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:568-573.
332. Rao, S.D., Banack, S.A., Cox, P.A., Weiss, J.H. (2006). BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Experimental Neurology*. 201:244-252.
333. Rapala, J., Sivonen, K., Lukkainen, R., Niemelä, S.I. (1993). Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains - a laboratory study. *Journal of Applied Phycology*. 5:581-591.
334. Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I. (1997). Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:2206-2212.
335. Rapala, J., Robertson, A., Negri, A.P., Berg, K.A., Tuomi, P., Lyra, C., Erkomaa, K., Lahti, K., Hoppu, K., Lepistö, L. (2005). First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environmental Toxicology*. 20:331-340.
336. Ravn, H., Schmidt, C.U., Sten, H., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P.H. (1995). Elicitation of *Alexandrium ostenfeldii* (dinophyceae) affects the toxin profile. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology*. 111:405-412.
337. Rawn, D.F., Niedzwiedek, B., Lau, B.P., Saker, M. (2007). Anatoxin-a and its metabolites in blue-green algae food supplements from Canada and Portugal. *Journal of Food Protection*. 70:776-779.
338. Reder, H. (2003). Algen als Nahrungsmittel. Seminararbeit an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Lehrstuhl Lebensmittelchemie.
http://www.pharmazie.uni-wuerzburg.de/Studium/Lmc/Seminare/Algen_als_Nahrungsmittel.pdf
(16.09.2008).
339. Ressler, C., Redstone, P.A., Erenberg, R.H. (1961). Isolation and identification of a neuroactive factor from *Lathyrus latifolius*. *Science*. 134:188-190.
340. Rinehart, K.L., Harada, K., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C.A., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Mulligan, P.E., Beasley, V.R., Dahlem, A.M., Carmichael, W.W. (1988). Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society*. 110:8557-8558.
341. Rinehart, K.L., Namikoshi, M., Choi, B.W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*. 6:159-176.
342. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 111(MAR):1-61.
343. Rippka, R., Herdman, M. (1992/1993). Pasteur Culture Collection of cyanobacterial strains. Catalogue and taxonomic handbook, Vol. I. *Institute Pasteur*, Paris, France.

344. Robillot, C., Vinh, J., Puiseux-Dao, S., Hennion, M.-C. (2000). Hepatotoxin production kinetics of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC-mass spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environmental Science and Technology*. 34:3372-3378.
345. Robinson, N.A., Pace, J.G., Matson, C.F., Miura, G.A., Lawrence, W.B. (1991). Tissue distribution, excretion, and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 256:176-182.
346. Romo, S., Bécares, E. (1992). Preservation of filamentous cyanobacteria cultures (*Pseudanabaena galeata*) Böcher and *Geitlerinema amphibium* (Ag. ex Gom.) Anagn. under low temperatures. *Journal of Microbiological Methods*. 16:85-89.
347. Rosén, J., Hellenäs, K. (2008). Determination of the neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L- alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst* 133:1785-1789.
348. Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R., Sivonen, K. (2004). Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:686-692.
349. Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C. (2007). Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes. *Toxicon*. 50:800-809.
350. Runnegar, M.T., Jackson, A.R., Falconer, I.R. (1988). Toxicity of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens. *Toxicon*. 26:143-151.
351. Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S.M., Lee, E.Y., Zhang, L. (1995a). In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 216:162-169.
352. Runnegar, M.T., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Lu, S.C. (1995b). Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. 49:219-225.
353. Sahin, A., Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Naegeli, H. (1996). Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology*. 106:123-130.
354. Saito, K., Konno, A., Ishii, H., Saito, H., Nishida, F., Abe, T., Chen, C.Y. (2001). Nodularin-Har: A new nodularin from *Nodularia*. *Journal of Natural Products*. 64:139-141.
355. Saker, M.L., Jungblut, A.D., Neilan, B.A., Rawn, D.F.K., Vasconcelos, V.M. (2005). Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon*. 46:555-562.
356. Saker, M.L., Welker, M., Vasconcelos, V.M. (2007). Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73:1136-1142.
357. Salazar, M., Chamorro, G., Salazar, S., Steele, C. (1996). Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproductive and peri- and postnatal development in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 34:353-359.
358. Salazar, M., Martinez, E., Madrigal, E., Ruiz, L.E., Chamorro, G. (1998). Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *Journal of Ethnopharmacology*. 62:235-241.
359. Samuels, R., Mani, U.V., Iyer, U.M., Nagaak, U.S. (2002). Hypocholesterolemic effects of *Spirulina* in patients with hyperlipidemic nephritic syndrome. *Journal of Medicinal Food*. 5:91-96.
360. Sandström, A., Glemarec, C., Meriluoto, J.A.O., Eriksson, J.E., Chattopadhyaya, J. (1990). Structure of a hepatotoxic pentapeptide from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon*. 28:535-540.

361. Sano, T., Kaya, K. (1995). A 2-amino-2-butenoic acid(Dhb)-containing microcystin isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron Letters*. 36:8603-8606.
362. Sano, T., Kaya, K. (1998). Two new (E)-2-amino-2-butenoic acid (Dhb)-containing microcystins isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron*. 54:463-470.
363. Sano, T., Beattie, K.A., Codd, G.A., Kaya, K. (1998). Two (Z)-dehydrobutyrine-containing microcystins from a hepatotoxic bloom of *Oscillatoria agardhii* from Souleat Loch, Scotland. *Journal of Natural Products*. 61:851-853.
364. Sano, T., Takagi, H., Kaya, K. (2004). A Dhb-microcystin from the filamentous cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Phytochemistry*. 65:2159-2162.
365. Sano, T., Takagi, H., Nishikawa, M., Kaya, K. (2008). NIES certified reference material for microcystins, hepatotoxic cyclic peptide toxins from cyanobacterial blooms in eutrophic water bodies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391:2005-2010.
366. Sawyer, P.J., Gentile, J.H., Sasner, J.J. Jr. (1968). Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Canadian Journal of Microbiology*. 14:1199-1204.
367. Schaefer, W.H. (2006). Reaction of primary and secondary amines to form carbamic acid glucuronides. *Current Drug Metabolism*. 7:873-881.
368. Schaeffer, D.J., Malpas, P.B., Barton, L.L. (1999). Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon-flos-aquae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44:73-80.
369. Schantz, E.J. (1986). Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 479:15-23.
370. Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P. (2001). Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*. 16:413-421.
371. Schleifer, K.H., Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*. 36:407-477.
372. Schopf, J.W. (1996). Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. *Nova Hedwigia, Beihefte*. 112:13-32.
373. Schwimmer, M., Schwimmer, D. (1968). Medical aspects of phycology. In: Jackson, D.F., ed. *Algae, man and the environment*. Syracuse, NY, Syracuse University Press, pp. 279-358.
374. Seawright, A.A., Ng, J.C., Oelrichs, P.B., Sani, Y., Nolan, C.C., Lister, A.T., Holton, J., Ray, D.E., Osborne, R. (1999). Recent toxicity studies in animals using chemicals derived from cycads. In *Biology and Conservation of Cycads - Proceedings of the Fourth International Conference on Cycad Biology 1996* Beijing: International Academic Publishers.
375. Seebach, D., Studer, A., Pfammatter, E., Widmer, H. (1994). Synthesis of tri-, penta-, and heptapeptides containing an (R)-2-Alkyl-2-amino-3-(methylamino)-propionic acid residue in the central position. *Helvetica Chimica Acta*. 77:2035-2050.
376. Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W., Shaw, G. (2007). First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae*. 6:73-80.
377. Selwood, A.I., Holland, P.T., Wood, S.A., Smith, K.F., McNabb, P.S. (2007). Production of anatoxin-a and a novel biosynthetic precursor by the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi*. *Environmental Science & Technology*. 41:506-510.
378. Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L. (2008). Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology*. 10:2476-2483.

379. Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Moore, M.R. (1999). Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environmental Toxicology*. 14:167-177.
380. Shaw, G.R., Seawright, A.A., Moore, M.R., Lam, P.K.S. (2000). Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicologic activity. *Therapeutic Drug Monitoring*. 22:89-92.
381. Shen, X.Y., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Wickramasinghe, W. (2002). Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon*. 40:1499-1501.
382. Sivonen, K., Kononen, K., Carmichael, W.W., Dahlem, A.M., Rinehart, K.L., Kiviranta, J., Niemela, S.I. (1989a). Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:1990-1995.
383. Sivonen, K., Himberg, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.I., Poon, G.K., Codd, G.A. (1989b) Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment*. 4:339-352.
384. Sivonen, K., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Dahlem, A.M., Niemela, S.I. (1990a). Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:2650-2657.
385. Sivonen, K. (1990b). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:2658-2666.
386. Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Sun, F., Rouhiainen, L., Luukkainen, R., Rinehart, K.L. (1992a). Isolation and characterization of a variety of microcystins from 7 strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2495-2500.
387. Sivonen, K., Skulberg, O.M., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. (1992b). 2-Methyl-ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. *Toxicon*. 30:1465-1471.
388. Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Fardig, M., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. (1992c). 3 New microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from *Nostoc* sp. strain 152. *Chemical Research in Toxicology*. 5:464-469.
389. Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Gromov, B.V., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. (1992d). Isolation and structures of 5 microcystins from a Russian *Microcystis aeruginosa* strain Calu-972. *Toxicon*. 30:1481-1485.
390. Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Andersen, R.A., Matsunaga, S., Moore, R.E., Skulberg, R. (1992). Investigations of a neurotoxic Oscillatorialean strain (*Cyanophyceae*) and its toxin - isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 11:321-329.
391. Sleno, L., Volmer, D.A., Kovacevic, B., Maksic, Z.B. (2004). Gas-phase dissociation reactions of protonated saxitoxin and neosaxitoxin. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 15:462-477.
392. Sleno, L., Volmer, D.A., Marshall, A.G. (2005). Assigning product ions from complex MS/MS spectra: The importance of mass uncertainty and resolving power. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 16:183-198.
393. Solow, R., Mereish, D.A., Anderson, G.W., Hewetson, J. (1990). Effect of microcystin-LR on cultured rat endothelial cells. *Journal of Medical Sciences Research*. 18:241-244.

394. Solter, P.F., Wollenberg, G.K., Huang, X., Chu, F.S., Runnegar, M.T. (1998). Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. *Toxicological Sciences*. 44:87-96.
395. Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A., Roy, D.N. (1986). Motorneurone disease on Guam: possible role of a food neurotoxin [letter]. *Lancet*. 1:965.
396. Spencer, P.S., Hunn, P.B., Nugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.H., Robertson, R.C. (1987). Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science*. 237:517-522.
397. Spencer, P.S. (1990). Linking cycad to the etiology of Western Pacific amyotrophic lateral sclerosis. In: Rose, F.C., Norris, F.H., eds. Amyotrophic lateral sclerosis. New advances in toxicology and epidemiology. London: Smith- Gordon. pp. 29-34.
398. Spencer, P.S., Kisby, G.E., Ludolph, A.C. (1991). Slow toxins, biologic markers, and long-latency neurodegenerative disease in the western Pacific region. *Neurology*. 41(5 Supplement 2):62-66 (discussion 66-68).
399. Spoof, L., Karlsson, K., Meriluoto, J.A.O. (2001). High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C18 and amide C16 sorbents. *Journal of Chromatography A*. 909:225-236.
400. Spoof, L., Berg, K.A., Rapala, J., Lahti, K., Lepisto, L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Meriluoto, J. (2006). First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environmental Toxicology*. 21:552-560.
401. Starr, R.C., Zeikus, J. (1993). UTEX: The culture of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology*. 29(Supplement 2):1-106.
402. Stevens, D.K., Krieger, R.I. (1988). Analysis of Anatoxin-a by GC-ECD. *Journal of Analytical Toxicology*. 12:126-131.
403. Stewart, I. (2004). Recreational exposure to freshwater cyanobacteria: Epidemiology, dermal toxicity and biological activity of cyanobacterial lipopolysaccharides. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Queensland, Australia.
404. Stoner, R.D., Adams, W.H., Slatkin, D.N., Siegelman, H.W. (1989). The effects of single L-amino acid substitutions on the lethal potencies of the microcystins. *Toxicon*. 27:825-828.
405. Stotts, R.R., Namikoshi, M., Haschek, W.M., Rinehart, K.L., Carmichael, W.W., Dahlem, A.M., Beasley, V.R. (1993). Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp. *Toxicon*. 31:783-789.
406. Strichartz, G., Rando, T., Hall, S., Gitschier, J., Hall, L., Magnani, B., Bay, C.H. (1986). On the mechanism by which saxitoxin binds to and blocks sodium-channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 479:96-112.
407. Subramaniam, A., Brown, C.W., Hood, R.R., Carpenter, E.J., Capone, D.G. (2002). Detecting *Trichodesmium* blooms in SeaWiFS imagery. *Deep Sea Research Part II*. 49:107-121.
408. Sukenik, A., Reisner, M., Carmeli, S., Werman, M. (2006). Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Long-term exposure to low doses. *Environmental Toxicology*. 21:575-582.
409. Sullivan, J.J., Wekell, M.M. (1984). Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-pressure liquid-chromatography. *ACS Symposium Series*. 262:197-205.
410. Suzuki, H., Watanabe, M.F., Wu, Y.P., Sugita, T., Kita, K., Sato, T., Wang, X.L., Tanzawa, H., Sekiya, S., Suzuki, N. (1998). Mutagenicity of microcystin-LR in human RSa cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2:109-112.

411. Synge, R.L.M. (1939). The Hofmann degradation of glutamine residues in gliadin. *The Biochemical Journal*. 33:671-678.
412. Takenaka, H., Yamaguchi, Y., Dakaki, S., Watara, K., Tanaka, N., Morinaga, T. (1998). Safety evaluation of *Nostoc flagelliforme* (Nostocales, Cyanophyceae) as a potential food. *Food and Chemical Toxicology*. 36:1073-1077.
413. Tanaka, J.Y., Walsh, J.R., Diller, K.R., Aggarwal, S.J., Brand, J.J. (1999). Application of model and design of algal cryopreservation protocols for dimethyl sulfoxide. The University of Texas, Austin, USA. <http://asme.pinetec.com/bio1999/data/pdfs/a0029948.pdf> (05.11.2008)
414. Teixeira M, Costa M, Carvalho, V., Pereira, M., Hage, E. (1993). Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organisation*. 27:244-253.
415. Thielert, G., Kaiser, I., Luckas, B. (1991). HPLC determination of PSP toxins. In: Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins. Paris: C.N.E.V.A.
416. Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Dohren, H., Borner, T., Neilan, B.A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry and Biology*. 7:753-764.
417. Tisdale, E.S. (1931). Epidemic of intestinal disorders in Charleston, W. Va., occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. *American Journal of Public Health*. 21:198-200.
418. TrinkwV (2001). Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. *Das Bundesministerium der Justiz*.
419. Turner, P.C., Gammie, A.J., Hollinrake, K., Codd, G.A. (1990). Pneumonia associated with cyanobacteria. *British Medical Journal*. 300:1440-1441.
420. Umweltbundesamt (2003). Empfehlung zum Schutz von Badenden vor Cyanobakterien-Toxinen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 46:530-538. <http://www.umweltbundesamt.de/gesundheits/publikationen/cyanotoxine.pdf> (06.07.2009)
421. Utkilen, H., Gjølme, N. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:797-800.
422. Van der Westhuizen, A.J., Eloff, J.N. (1983). Effect of culture age and pH of culture medium on the growth and toxicity of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 110:157-163.
423. Van der Westhuizen, A.J., Eloff, J.N. (1985). Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*. 163:55-59.
424. Vega, A., Bell, E.A. (1967). Alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry*. 6:759-762.
425. VERORDNUNG (EG) Nr. 853/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union.
426. VERORDNUNG (EG) Nr. 2074/2005 DER KOMMISSION vom 5. Dezember 2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004. Amtsblatt der Europäischen Union.

427. VERORDNUNG (EG) Nr. 1924/2006 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 20. Dezember 2006 über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel. Berichtigung vom 18.01.2007. Amtsblatt der Europäischen Union.
428. Vessey, J.K., Pawlowski, K., Bergman, B. (2005). Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil*. 266:205-230.
429. Voltarelli, F.A., de Mello, M.A. (2008). Spirulina enhanced the skeletal muscle protein in growing rats. *European Journal of Nutrition*. Epub ahead of print.
430. Watanabe, M.F., Oishi, S., Harada, K.I., Matsuura, K., Kawai, H., Suzuki, M. (1988). Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*. 26:1017-1025.
431. Watanabe, M.M., Sawaguchi, T. (1995). Cryopreservation of a water-bloom forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* f. *aeruginosa*. *Phycological Research*. 43:111-116.
432. Watanabe, F., Takenaka, S., Kittaka-Katsura, H., Ebara, S., Miyamoto, E. (2002). Characterization and bioavailability of vitamin B₁₂ compounds from edible algae. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 48:325-331.
433. Weller, M. (2002). Algengifte im Wasser. *Nachrichten aus der Chemie*. 50:700-705.
434. Whiting, M.G. (1963). Toxicity of cycads. *Economic Botany*. 17:271-302.
435. Wickramasinghe, W., Shaw, G., Eaglesham, G. (2008). Search for the presence of neurotoxic amino acid BMAA (β-methyl amino L-alanine) in some aquatic cyanobacteria from Australian waters. International Society For the Study of Harmful Algae. The 13th International Conference on Harmful Algae, Nov. 3-7 2008 Hong Kong:150.
436. Wiedner, C., Rücker, J., Stüken, A., Preußel, K., Fastner, J., Chorus, I., Nixdorf, B. (2007). *Cylindrospermopsis raciborskii* und *Cylindrospermopsis* in Gewässern der Berliner Region - Vorkommen, Ursachen, Auswirkungen. *Schriftenreihe Kompetenzzentrum Wasser Berlin*. Band 6.
437. Wood, S.A., Rasmussen, J. P., Holland, P.T., Campbell, R., Crowe, A.L.M. (2007). First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*. 43:356-365.
438. Wood, S.A., Rhodes, L.L., Adams, S.L., Adamson, J.E., Smith, K.F., Smith, J.F., Tervit, H.R., Cary, S.C. (2008). Maintenance of cyanotoxin production by cryopreserved cyanobacteria in the New Zealand culture collection. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 42:277-283.
439. World Health Organization (2003). Guidelines for safe recreational water environments, Volume 1 Coastal & Fresh Waters.
440. Wright, J.L.C. (1995). Dealing with seafood toxins - present approaches and future options. *Food Research International*. 28:347-358.
441. Xie, L.Q., Xie, P., Guo, L.G., Li, L., Miyabara, Y., Park, H.D. (2005). Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology*. 20:293-300.
442. Yatsunami, J., Komori, A., Ohta, T., Suganuma, M., Fujiki, H. (1993). Hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and p53 by okadaic acid, a tumor promoter. *Cancer Research*. 53:239-241.
443. Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M.F., Harada, K., Ichihara, A., Carmichael, W.W., Fujiki, H. (1990). Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 116:609-614.
444. Yu, S.Z. (1995). Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 10:674-682.

445. Yu, F.Y., Liu, B.H., Chou, H.N., Chu, F.S. (2002). Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:4176-4182.
446. Yuan, M., Namikoshi, M., Otsuki, A., Sivonen, K. (1998). Effect of amino acid side-chain on fragmentation of cyclic peptide ions: differences of electrospray ionization collision-induced decomposition mass spectra of toxic heptapeptide microcystins containing ADMAdda instead of Adda. *European Mass Spectrometry*. 4:287-298.
447. Yuan, M., Namikoshi, M., Otsuki, A., Rinehart, K.L., Sivonen, K., Watanabe, M.F. (1999a). Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 34:33-43.
448. Yuan, M., Namikoshi, M., Otsuki, A., Watanabe, M.F., Rinehart, K.L. (1999b). Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: Modulation of charge states and $[M+H]^{(+)}$ to $[M+Na]^{(+)}$ ratio. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 10:1138-1151.
449. Zhang, W., Lin, Y., Guo, D., Fu, J., Zhao, Y. (2006). Influence of different nitrogen and phosphorus concentrations on growth, photosynthesis and microcystin production of *Microcystis aeruginosa*. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 30:318-322.

Publikationen

Artikel in wissenschaftlichen Journalen und Tagungsbänden (*Peer-Reviewed*):

1. Krüger, T., Oelmüller, R., Hiller, S., Luckas, B. (2008). Differences within the nodularin synthetase gene cluster between toxic *Nodularia spumigena* and non-toxic *Nodularia harveyana*. In: Moestrup, Ø. et al. (eds) Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2008 Copenhagen. 68-71.
2. Krüger, T., Oelmüller, R., Luckas, B. (2009). Comparative PCR analysis of toxic *Nodularia spumigena* and non-toxic *Nodularia harveyana* (Nostocales, Cyanobacteria) with respect to the nodularin synthetase gene cluster. *European Journal of Phycology*. 44:291-295.
3. Krüger, T., Christian, B., Luckas, B. (2009). Development of an analytical method for the unambiguous structure elucidation of cyclic peptides with special appliance for hepatotoxic desmethylated microcystins. *Toxicon*. 54:302-312.
4. Wuertz, S., Gröper, B., Gessner, J., Krüger, T., Luckas, B., Krüger, A. (2009). Identification of caviar from increasing global aquaculture production - Dietary capric acid as a labelling tool for CITES implementation in caviar trade. *Aquaculture*. 298:51-56.
5. Krüger, T., Mönch, B., Oppenhäuser, S., Luckas, B. (2010). LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius*. *Toxicon*. 55:547-557.

Posterpräsentationen auf internationalen Fachtagungen:

1. Krüger, T., Oelmüller, R., Hiller, S., Luckas, B.: Genetic diversity within Baltic Sea populations of nodularin-producing *Nodularia spumigena* and non-toxic *Nodularia harveyana*. 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, September 4-8, 2006.
2. Krüger, T., Christian, B., Pinto, E., Luckas, B.: Simultaneous determination of MC-LR, -RR, -YR and their desmethylated variants by application of the modified HPLC-UV method ISO 20179. 7th International Conference on Toxic Cyanobacteria, Rio de Janeiro State, Brazil, August 5-10, 2007.
3. Ahmed, S., Krüger, T., Luckas, B.: *Anabaena* sp. bloom and the occurrence of microcystins from an eutrophic pond in Bangladesh. 13th International Conference on Harmful Algae, Hong Kong, November 3-7, 2008.
4. Krüger, T., Mönch, B., Luckas, B.: LC-MS/MS determination of BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and cycad seeds without derivatization. 18th International Mass Spectrometry Conference, Bremen, Germany, August 30 - September 4, 2009.
5. Christian, B., Krüger, T., Pinto, E., Moura, S., Luckas, B.: Stereospecific determination of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in seeds of *Cycas revoluta* by application of GC-MS method. 18th International Mass Spectrometry Conference, Bremen, Germany, August 30 - September 4, 2009.
6. Krüger, T., Mundt, S., Bröker, D., Luckas, B.: Dog poisonings caused by *Nodularia spumigena*. 46th Congress of the European Societies of Toxicology, Dresden, September 13-16, 2009.
7. Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B., Schrenk, D.: Cytotoxicity of microcystins and nodularin. 46th Congress of the European Societies of Toxicology, Dresden, September 13-16, 2009.

Vorträge auf nationalen und internationalen Fachtagungen:

1. Krüger, T., Christian, B., Luckas, B.: Does desmethyl-microcystin-LR contain N-methyldehydroalanine, dehydroalanine or dehydrobutyrine in position 7? 11th International Conference on Applied Phycology, Galway, Ireland, June 21-27, 2008.
2. Krüger, T.: Zur Problematik der Erfassung von β -N-Methylamino-L-Alanin (BMAA) in Nahrungsergänzungsmitteln auf Mikroalgenbasis. Jahrestagung der Regionalverbände Nord, Nordost, Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LchG) - Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker am 2. und 3. April 2009 im Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin (BfR).

Anhang

Tab. 19 Nitrat-Experiment: Trockengewichte von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage- Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 0	N0	0,1511	0,1520	0,050	0,0009	0,0021	59,33	64,33 ± 6,03	49,34 – 79,32
	N1	0,1295	0,1308	0,050	0,0013	0,0021	67,33		
	N2	0,1338	0,1346	0,050	0,0008	0,0021	57,33		
	N3	0,1474	0,1484	0,050	0,0010	0,0021	61,33		
	N4	0,1304	0,1317	0,050	0,0013	0,0021	67,33		
	N5	0,1483	0,1499	0,050	0,0016	0,0021	73,33		
Woche 1	N0a	0,1319	0,1372	0,025	0,0053	0,0024	306,67	316,00 ± 23,44	257,77 – 374,23
	N0b	0,1274	0,1336	0,025	0,0062	0,0024	342,67		
	N0c	0,1493	0,1544	0,025	0,0051	0,0024	298,67		
	N1a	0,1201	0,1260	0,025	0,0059	0,0024	330,67	328,00 ± 8,33	307,31 – 348,69
	N1b	0,1506	0,1562	0,025	0,0056	0,0024	318,67		
	N1c	0,1266	0,1326	0,025	0,0060	0,0024	334,67		
	N2a	0,1320	0,1377	0,025	0,0057	0,0024	322,67	322,67 ± 12,00	292,85 – 352,48
	N2b	0,1497	0,1551	0,025	0,0054	0,0024	310,67		
	N2c	0,1243	0,1303	0,025	0,0060	0,0024	334,67		
	N3a	0,1512	0,1563	0,025	0,0051	0,0024	298,67	310,67 ± 12,00	280,85 – 340,48
	N3b	0,1243	0,1300	0,025	0,0057	0,0024	322,67		
	N3c	0,1350	0,1404	0,025	0,0054	0,0024	310,67		
	N4a	0,1447	0,1500	0,025	0,0053	0,0024	306,67	302,67 ± 4,00	292,73 – 312,60
	N4b	0,1348	0,1400	0,025	0,0052	0,0024	302,67		
	N4c	0,1497	0,1548	0,025	0,0051	0,0024	298,67		
	N5a	0,1303	0,1347	0,025	0,0044	0,0024	270,67	280,00 ± 8,33	259,31 – 300,69
	N5b	0,1367	0,1415	0,025	0,0048	0,0024	286,67		
	N5c	0,1434	0,1481	0,025	0,0047	0,0024	282,67		
Woche 2	N0a	0,1489	0,1556	0,025	0,0067	0,0021	350,67	356,00 ± 9,24	333,05 – 378,95
	N0b	0,1239	0,1310	0,025	0,0071	0,0021	366,67		
	N0c	0,1497	0,1564	0,025	0,0067	0,0021	350,67		
	N1a	0,1244	0,1322	0,025	0,0078	0,0021	394,67	397,33 ± 4,62	385,86 – 408,81
	N1b	0,1339	0,1417	0,025	0,0078	0,0021	394,67		
	N1c	0,1444	0,1524	0,025	0,0080	0,0021	402,67		
	N2a	0,1357	0,1457	0,025	0,0100	0,0021	482,67	445,33 ± 45,49	332,32 – 558,35
	N2b	0,1509	0,1587	0,025	0,0078	0,0021	394,67		
	N2c	0,1360	0,1454	0,025	0,0094	0,0021	458,67		
	N3a	0,1372	0,1462	0,025	0,0090	0,0021	442,67	440,00 ± 28,10	370,20 – 509,80
	N3b	0,1471	0,1553	0,025	0,0082	0,0021	410,67		
	N3c	0,1351	0,1447	0,025	0,0096	0,0021	466,67		
	N4a	0,1525	0,1601	0,025	0,0076	0,0021	386,67	389,33 ± 8,33	368,65 – 410,02
	N4b	0,1359	0,1438	0,025	0,0079	0,0021	398,67		
	N4c	0,1528	0,1603	0,025	0,0075	0,0021	382,67		
	N5a	0,1343	0,1413	0,025	0,0070	0,0021	362,67	378,67 ± 46,13	264,06 – 493,27
	N5b	0,1355	0,1442	0,025	0,0087	0,0021	430,67		
	N5c	0,1507	0,1572	0,025	0,0065	0,0021	342,67		
Woche 3	N0a	0,1529	0,1516	0,025	-0,0013	0,0019	24,00	37,33 ± 19,73	---
	N0b	0,1521	0,1509	0,025	-0,0012	0,0019	28,00		
	N0c	0,1333	0,1329	0,025	-0,0004	0,0019	60,00		
	N1a	0,1333	0,1365	0,025	0,0032	0,0019	204,00	189,33 ± 25,40	126,22 – 252,44
	N1b	0,1527	0,1559	0,025	0,0032	0,0019	204,00		
	N1c	0,1504	0,1525	0,025	0,0021	0,0019	160,00		
	N2a	0,1339	0,1363	0,025	0,0024	0,0019	172,00	188,00 ± 34,87	101,37 – 274,63
	N2b	0,1523	0,1545	0,025	0,0022	0,0019	164,00		
	N2c	0,1461	0,1499	0,025	0,0038	0,0019	228,00		
	N3a	0,1446	0,1476	0,025	0,0030	0,0019	196,00	201,33 ± 24,44	140,61 – 262,05
	N3b	0,1517	0,1555	0,025	0,0038	0,0019	228,00		
	N3c	0,1314	0,1340	0,025	0,0026	0,0019	180,00		
	N4a	0,1542	0,1592	0,025	0,0050	0,0019	276,00	228,00 ± 69,74	54,74 – 401,26
	N4b	0,1510	0,1528	0,025	0,0018	0,0019	148,00		
	N4c	0,1369	0,1415	0,025	0,0046	0,0019	260,00		
	N5a	0,1318	0,1367	0,025	0,0049	0,0019	272,00	265,33 ± 8,33	244,65 – 286,02
	N5b	0,1423	0,1468	0,025	0,0045	0,0019	256,00		
	N5c	0,1539	0,1587	0,025	0,0048	0,0019	268,00		
Woche 4	N0a	0,1538	0,1520	0,025	-0,0018	0,0028	38,67	45,33 ± 15,14	7,71 – 82,96
	N0b	0,1540	0,1521	0,025	-0,0019	0,0028	34,67		
	N0c	0,1350	0,1338	0,025	-0,0012	0,0028	62,67		
	N1a	0,1336	0,1383	0,025	0,0047	0,0028	298,67	281,33 ± 26,63	215,17 – 347,50
	N1b	0,1512	0,1558	0,025	0,0046	0,0028	294,67		
	N1c	0,1525	0,1560	0,025	0,0035	0,0028	250,67		
	N2a	0,1529	0,1559	0,025	0,0030	0,0028	230,67	276,00 ± 44,06	166,54 – 385,46
	N2b	0,1374	0,1416	0,025	0,0042	0,0028	278,67		
	N2c	0,1335	0,1387	0,025	0,0052	0,0028	318,67		
	N3a	0,1461	0,1500	0,025	0,0039	0,0028	266,67	301,33 ± 36,07	211,71 – 390,95
	N3b	0,1456	0,1513	0,025	0,0057	0,0028	338,67		
	N3c	0,1516	0,1563	0,025	0,0047	0,0028	298,67		
	N4a	0,1352	0,1423	0,025	0,0071	0,0028	394,67	332,00 ± 64,04	172,90 – 491,10
	N4b	0,1323	0,1362	0,025	0,0039	0,0028	266,67		
	N4c	0,1560	0,1616	0,025	0,0056	0,0028	334,67		
	N5a	0,1500	0,1569	0,025	0,0069	0,0028	386,67	393,33 ± 8,33	372,65 – 414,02
	N5b	0,1514	0,1584	0,025	0,0070	0,0028	390,67		
	N5c	0,1330	0,1403	0,025	0,0073	0,0028	402,67		
Woche 5	N0a	0,1279	0,1267	0,025	-0,0012	0,0026	54,67	44,00 ± 9,24	21,05 – 66,95
	N0b	0,1534	0,1518	0,025	-0,0016	0,0026	38,67		
	N0c	0,1502	0,1486	0,025	-0,0016	0,0026	38,67		
	N1a	0,1484	0,1525	0,025	0,0041	0,0026	266,67	244,00 ± 22,03	189,27 – 298,73
	N1b	0,1333	0,1368	0,025	0,0035	0,0026	242,67		
	N1c	0,1303	0,1333	0,025	0,0030	0,0026	222,67		
	N2a	0,1533	0,1552	0,025	0,0019	0,0026	178,67	216,00 ± 40,27	115,97 – 316,03
	N2b	0,1507	0,1534	0,025	0,0027	0,0026	210,67		
	N2c	0,1490	0,1529	0,025	0,0039	0,0026	258,67		

Fortsetzung Tab. 19 Nitrat-Experiment: Trockengewichte von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 5	N3a	0,1321	0,1356	0,025	0,0035	0,0026	242,67	228,00 ± 32,58	147,06 – 308,94
	N3b	0,1319	0,1356	0,025	0,0037	0,0026	250,67		
	N3c	0,1544	0,1566	0,025	0,0022	0,0026	190,67		
	N4a	0,1551	0,1593	0,025	0,0042	0,0026	270,67	268,00 ± 28,10	198,20 – 337,80
	N4b	0,1473	0,1507	0,025	0,0034	0,0026	238,67		
	N4c	0,1327	0,1375	0,025	0,0048	0,0026	294,67		
	N5a	0,1283	0,1339	0,025	0,0056	0,0026	326,67	296,00 ± 30,02	221,41 – 370,59
	N5b	0,1549	0,1590	0,025	0,0041	0,0026	266,67		
	N5c	0,1578	0,1626	0,025	0,0048	0,0026	294,67		
Woche 6	N0a	0,1316	0,1309	0,025	-0,0007	0,0020	50,67	48,00 ± 2,31	42,26 – 53,74
	N0b	0,1541	0,1533	0,025	-0,0008	0,0020	46,67		
	N0c	0,1552	0,1544	0,025	-0,0008	0,0020	46,67		
	N1a	0,1501	0,1577	0,025	0,0076	0,0020	382,67	334,78 ± 42,15	230,07 – 439,48
	N1b	0,1333	0,1374	0,020	0,0041	0,0020	303,33		
	N1c	0,1340	0,1384	0,020	0,0044	0,0020	318,33		
	N2a	0,1527	0,1557	0,020	0,0030	0,0020	248,33	306,67 ± 76,54	116,52 – 496,82
	N2b	0,1544	0,1580	0,020	0,0036	0,0020	278,33		
	N2c	0,1253	0,1312	0,020	0,0059	0,0020	393,33		
	N3a	0,1485	0,1541	0,020	0,0056	0,0020	378,33	323,33 ± 63,84	164,74 – 481,92
	N3b	0,1235	0,1283	0,020	0,0048	0,0020	338,33		
	N3c	0,1491	0,1522	0,020	0,0031	0,0020	253,33		
	N4a	0,1282	0,1352	0,020	0,0070	0,0020	448,33	440,00 ± 28,43	369,37 – 510,63
	N4b	0,1451	0,1513	0,020	0,0062	0,0020	408,33		
	N4c	0,1496	0,1569	0,020	0,0073	0,0020	463,33		
	N5a	0,1305	0,1377	0,020	0,0072	0,0020	458,33	465,00 ± 11,55	436,31 – 493,69
	N5b	0,1302	0,1374	0,020	0,0072	0,0020	458,33		
	N5c	0,1521	0,1597	0,020	0,0076	0,0020	478,33		

Tab. 20 Nitrat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 0	N0	15	5	0,062	-0,001	2,52	2,50 ± 0,10	2,26 – 2,74
	N1	15	5	0,060	-0,001	2,44		
	N2	15	5	0,061	-0,005	2,64		
	N3	15	5	0,060	-0,004	2,56		
	N4	15	5	0,060	-0,002	2,48		
	N5	15	5	0,053	-0,006	2,36		
Woche 1	N0a	5	5	0,107	0,001	12,71	12,11 ± 0,75	10,25 – 13,97
	N0b	5	5	0,096	0,002	11,27		
	N0c	5	5	0,103	0,000	12,35		
	N1a	5	5	0,106	0,002	12,47	13,19 ± 0,67	11,53 – 14,85
	N1b	5	5	0,117	0,002	13,79		
	N1c	5	5	0,113	0,002	13,31		
	N2a	5	5	0,146	0,002	17,27	15,43 ± 2,07	10,29 – 20,56
	N2b	5	5	0,113	0,003	13,19		
	N2c	5	5	0,134	0,002	15,83		
	N3a	5	5	0,110	0,001	13,07	13,55 ± 0,43	12,48 – 14,63
	N3b	5	5	0,118	0,002	13,91		
	N3c	5	5	0,114	0,000	13,67		
	N4a	5	5	0,127	0,000	15,23	13,75 ± 1,28	10,56 – 16,93
	N4b	5	5	0,107	-0,002	13,07		
	N4c	5	5	0,105	-0,003	12,95		
	N5a	5	5	0,119	-0,001	14,39	14,11 ± 0,30	13,36 – 14,86
	N5b	5	5	0,115	-0,003	14,15		
	N5c	5	5	0,112	-0,003	13,79		
Woche 2	N0a	5	5	0,080	0,004	9,11	8,55 ± 0,48	7,25 – 9,76
	N0b	5	5	0,073	0,004	8,27		
	N0c	5	5	0,072	0,003	8,27		
	N1a	5	5	0,305	0,004	36,09	34,81 ± 1,11	32,06 – 37,56
	N1b	5	5	0,290	0,005	34,17		
	N1c	5	5	0,294	0,009	34,17		
	N2a	5	5	0,353	0,004	41,85	39,05 ± 2,50	32,85 – 45,25
	N2b	5	5	0,313	0,004	37,05		
	N2c	5	5	0,328	0,009	38,25		
	N3a	5	5	0,327	0,004	38,73	38,09 ± 2,34	32,26 – 43,91
	N3b	5	5	0,301	0,005	35,49		
	N3c	5	5	0,341	0,007	40,05		
	N4a	5	5	0,251	0,007	29,26	31,53 ± 2,55	25,19 – 37,87
	N4b	5	5	0,290	0,004	34,29		
	N4c	5	5	0,266	0,007	31,06		
	N5a	5	5	0,217	0,004	25,54	26,46 ± 2,47	20,32 – 32,59
	N5b	5	5	0,245	0,001	29,26		
	N5c	5	5	0,210	0,005	24,58		
Woche 3	N0a	5	5	0,006	0,002	0,48	0,48 ± 0,24	---
	N0b	5	5	0,004	0,002	0,24		
	N0c	5	5	0,005	-0,001	0,72		
	N1a	5	5	0,108	0,005	12,35	13,87 ± 2,84	6,81 – 20,93
	N1b	5	5	0,105	0,004	12,11		
	N1c	5	5	0,166	0,023	17,15		
	N2a	5	5	0,146	0,010	16,31	16,51 ± 1,63	12,46 – 20,55
	N2b	5	5	0,163	0,011	18,23		
	N2c	5	5	0,136	0,011	14,99		
	N3a	5	5	0,134	0,005	15,47	14,51 ± 1,98	9,59 – 19,43
	N3b	5	5	0,107	0,005	12,23		
	N3c	5	5	0,147	0,015	15,83		
	N4a	5	5	0,151	0,003	17,75	17,07 ± 0,66	15,43 – 18,71
	N4b	5	5	0,144	0,007	16,43		
	N4c	5	5	0,146	0,004	17,03		

Fortsetzung Tab. 20 Nitrat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 4	N5a	5	5	0,090	-0,002	11,03	13,47 ± 2,15	8,12 – 18,82
	N5b	5	5	0,122	0,003	14,27		
	N5c	5	5	0,127	0,001	15,11		
	N0a	5	1	0,050	0,005	1,08	0,94 ± 0,14	0,58 – 1,30
	N0b	5	1	0,038	0,005	0,79		
	N0c	5	1	0,045	0,005	0,96		
	N1a	5	5	0,161	0,007	18,47	20,26 ± 2,00	15,29 – 25,24
	N1b	5	5	0,174	0,008	19,90		
	N1c	5	5	0,209	0,022	22,42		
	N2a	5	5	0,201	0,010	22,90	21,82 ± 0,94	19,49 – 24,15
	N2b	5	5	0,190	0,013	21,22		
	N2c	5	5	0,198	0,020	21,34		
Woche 5	N3a	5	5	0,164	0,009	18,59	18,75 ± 2,04	13,67 – 23,82
	N3b	5	5	0,146	0,006	16,79		
	N3c	5	5	0,188	0,014	20,86		
	N4a	5	5	0,213	0,009	24,46	23,06 ± 1,28	19,88 – 26,25
	N4b	5	5	0,201	0,018	21,94		
	N4c	5	5	0,203	0,013	22,78		
	N5a	5	5	0,164	0,003	19,30	21,10 ± 4,31	10,40 – 31,81
	N5b	5	5	0,154	0,004	17,99		
	N5c	5	5	0,220	0,003	26,02		
	N0a	5	1	0,020	0,003	0,41	0,50 ± 0,20	0,01 – 0,98
	N0b	5	1	0,019	0,004	0,36		
	N0c	5	1	0,029	-0,001	0,72		
Woche 6	N1a	5	5	0,127	0,007	14,39	12,39 ± 1,87	7,73 – 17,05
	N1b	5	5	0,105	0,004	12,11		
	N1c	5	5	0,090	0,001	10,67		
	N2a	5	5	0,088	0,004	10,07	11,87 ± 1,86	7,25 – 16,49
	N2b	5	5	0,104	0,006	11,75		
	N2c	5	5	0,120	0,005	13,79		
	N3a	5	5	0,138	0,004	16,07	11,71 ± 3,78	2,33 – 21,09
	N3b	5	5	0,082	0,001	9,71		
	N3c	5	5	0,080	0,002	9,35		
	N4a	5	5	0,110	0,001	13,07	13,75 ± 0,62	12,22 – 15,28
	N4b	5	5	0,123	0,004	14,27		
	N4c	5	5	0,117	0,001	13,91		
Woche 6	N5a	5	5	0,094	-0,002	11,51	12,23 ± 2,59	5,79 – 18,67
	N5b	5	5	0,080	-0,004	10,07		
	N5c	5	5	0,123	-0,003	15,11		
	N0a	5	1	0,039	0,004	0,84	0,85 ± 0,01	0,81 – 0,88
	N0b	5	1	0,038	0,003	0,84		
	N0c	5	1	0,037	0,001	0,86		
	N1a	5	5	0,214	0,007	24,82	18,19 ± 6,32	2,48 – 33,89
	N1b	5	5	0,150	0,004	17,51		
	N1c	5	5	0,109	0,007	12,23		
	N2a	5	5	0,107	0,006	12,11	15,55 ± 3,13	7,78 – 23,31
	N2b	5	5	0,145	0,009	16,31		
	N2c	5	5	0,159	0,007	18,23		
Woche 6	N3a	5	5	0,210	0,007	24,34	17,47 ± 6,12	2,25 – 32,68
	N3b	5	5	0,132	0,003	15,47		
	N3c	5	5	0,112	0,007	12,59		
	N4a	5	5	0,217	0,005	25,42	24,98 ± 0,98	22,55 – 27,41
	N4b	5	5	0,222	0,008	25,66		
	N4c	5	5	0,205	0,006	23,86		
	N5a	5	5	0,186	0,002	22,06	24,10 ± 4,83	12,10 – 36,10
	N5b	5	5	0,173	0,001	20,62		
	N5c	5	5	0,248	0,001	29,62		

Tab. 21 Nitrat-Experiment: Microcystingehalte ($\mu\text{g g}^{-1}$) von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	MC-RR	dm-MC-RR	MC-LA	dm-MC-LA	MC-LR	dm-MC-LR	MC-YR	Σ MCs
Woche 2	N (Woche 0)	380,33	28,16	100,71	17,60	327,01	62,81	8,79	925,42
	N0a	130,52	9,63	102,61	11,20	210,24	30,13	6,61	500,94
	N0b	130,59	9,79	102,35	11,78	208,63	31,21	7,00	501,34
	N0c	123,88	9,81	109,80	11,77	210,41	30,52	7,37	503,55
	N0 (0 ± S)	128,33 ± 3,86	9,74 ± 0,1	104,92 ± 4,22	11,58 ± 0,33	209,76 ± 0,98	30,62 ± 0,55	6,99 ± 0,38	501,95 ± 1,40
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	118,75-137,91	9,50-9,98	94,42-115,42	10,76-12,4	207,32-212,20	29,26-31,98	6,05-7,94	498,46-505,43
	N1a	160,22	14,76	94,53	14,05	226,82	51,73	6,15	568,26
	N1b	127,14	12,92	89,59	13,42	186,25	46,95	5,26	481,52
	N1c	147,06	15,09	98,35	13,88	225,00	49,65	6,40	555,43
	N1 (0 ± S)	144,81 ± 16,66	14,26 ± 1,17	94,15 ± 4,39	13,79 ± 0,33	212,69 ± 22,92	49,44 ± 2,40	5,94 ± 0,60	535,07 ± 46,82
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	103,43-186,18	11,34-17,17	83,25-105,06	12,97-14,60	155,75-269,63	43,49-55,40	4,45-7,42	418,76-651,38
	N2a	72,92	7,99	60,30	10,57	117,44	32,55	3,82	305,60
Woche 2	N2b	102,18	12,09	69,05	11,55	164,29	39,03	4,96	403,15
	N2c	93,05	10,52	68,31	11,14	143,90	34,23	4,83	365,98
	N2 (0 ± S)	89,39 ± 14,97	10,20 ± 2,07	65,88 ± 4,85	11,09 ± 0,49	141,88 ± 23,49	35,27 ± 3,36	4,54 ± 0,62	358,24 ± 49,23
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	52,20-126,58	5,07-15,34	53,83-77,94	9,87-12,31	83,52-200,23	26,91-43,63	2,99-6,09	235,93-480,56
	N3a	62,76	8,38	44,76	8,00	103,32	28,45	3,31	258,99
	N3b	65,71	9,85	51,79	9,60	109,82	33,25	3,63	283,64
	N3c	68,23	7,79	46,32	7,49	104,52	25,19	3,60	263,14
	N3 (0 ± S)	65,57 ± 2,74	8,67 ± 1,06	47,62 ± 3,69	8,37 ± 1,10	105,89 ± 3,46	28,96 ± 4,05	3,51 ± 0,17	268,59 ± 13,20
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	58,77-72,36	6,04-11,31	38,45-56,79	5,63-11,10	97,29-114,48	18,90-39,03	3,09-3,94	235,79-301,39
	N4a	72,48	11,40	41,38	8,54	106,40	35,95	3,35	279,50
	N4b	60,81	9,12	30,69	6,04	88,42	25,10	2,97	223,15
	N4c	75,64	11,74	45,09	8,55	110,91	31,99	3,56	287,48
	N4 (0 ± S)	69,64 ± 7,81	10,75 ± 1,43	39,05 ± 7,47	7,71 ± 1,45	101,91 ± 11,90	31,02 ± 5,49	3,30 ± 0,30	263,38 ± 35,06
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	50,24-89,04	7,21-14,30	20,49-57,62	4,12-11,30	72,35-131,47	17,37-44,66	2,55-4,04	176,27-350,48

Fortsetzung Tab. 21 Nitrat-Experiment: Microcystingehalte ($\mu\text{g g}^{-1}$) von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	MC-RR	dm-MC-RR	MC-LA	dm-MC-LA	MC-LR	dm-MC-LR	MC-YR	Σ MCs
Woche 2	N5a	95,06	13,01	42,82	7,92	122,22	29,25	3,70	313,98
	N5b	49,83	8,84	25,61	6,44	81,86	27,07	2,36	202,00
	N5c	90,98	13,85	34,57	7,20	119,41	32,97	3,73	302,70
	N5 ($\bar{O} \pm S$)	78,62 \pm 25,02	11,90 \pm 2,68	34,33 \pm 8,61	7,19 \pm 0,74	107,83 \pm 22,53	29,76 \pm 2,99	3,26 \pm 0,78	272,89 \pm 61,65
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	16,47-140,78	5,23-18,56	12,95-55,71	5,35-9,03	51,85-163,81	22,34-37,18	1,32-5,20	119,73-426,06
	N0a	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N0b	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N0c	263,02	23,53	97,40	8,70	0,00	42,74	14,32	449,71
	N0 ($\bar{O} \pm S$)	87,67 \pm 151,86	7,84 \pm 13,58	32,47 \pm 56,23	2,90 \pm 5,02	14,25 \pm 24,68	0,00 \pm 0,00	4,77 \pm 8,27	149,90 \pm 259,64
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	n.d.	---	---	---
	N1a	105,98	11,90	38,95	4,39	116,99	15,08	3,38	296,66
Woche 4	N1b	122,49	13,51	47,23	5,48	128,82	17,25	3,93	338,70
	N1c	41,52	5,19	19,25	2,29	56,10	8,55	1,82	134,71
	N1 ($\bar{O} \pm S$)	90,00 \pm 42,79	10,20 \pm 4,41	35,14 \pm 14,37	4,05 \pm 1,62	100,64 \pm 39,02	13,63 \pm 4,53	3,04 \pm 1,10	256,69 \pm 107,71
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	---	---	---	---
	N2a	18,30	2,34	8,48	1,19	22,86	3,88	0,95	58,01
	N2b	23,37	3,04	9,82	1,39	28,37	4,85	1,14	71,97
	N2c	62,76	7,64	29,16	3,90	72,18	11,35	3,01	190,00
	N2 ($\bar{O} \pm S$)	34,81 \pm 24,34	4,34 \pm 2,88	15,82 \pm 11,57	2,16 \pm 1,51	41,13 \pm 27,02	6,69 \pm 4,06	1,70 \pm 1,14	106,66 \pm 72,51
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	---	---	---	---
	N3a	27,47	3,51	9,87	1,64	32,70	5,78	1,19	82,16
Woche 6	N3b	97,79	10,58	33,27	4,53	106,86	14,59	3,54	271,15
	N3c	23,56	2,79	7,74	1,12	25,28	3,82	1,06	65,37
	N3 ($\bar{O} \pm S$)	49,61 \pm 41,77	5,63 \pm 4,30	16,96 \pm 14,17	2,43 \pm 1,84	54,95 \pm 45,11	8,06 \pm 5,74	1,93 \pm 1,39	139,56 \pm 114,27
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	---	---	---	---
	N4a	78,09	9,88	25,95	4,20	105,12	18,08	2,43	243,76
	N4b	29,67	3,70	7,92	1,21	32,57	5,28	1,05	81,40
	N4c	89,25	10,80	29,35	4,35	107,17	18,07	2,82	261,81
	N4 ($\bar{O} \pm S$)	65,67 \pm 31,67	8,12 \pm 3,86	21,08 \pm 11,52	3,25 \pm 1,77	81,62 \pm 42,49	13,81 \pm 7,39	2,10 \pm 0,93	195,65 \pm 99,36
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	---	---	---	---
	N5a	149,25	23,08	32,50	6,33	170,15	35,50	3,50	420,31
Woche 8	N5b	195,24	27,87	45,85	8,66	223,61	40,21	4,37	545,81
	N5c	143,34	22,83	27,71	5,96	154,78	35,13	3,05	392,81
	N5 ($\bar{O} \pm S$)	162,61 \pm 28,41	24,59 \pm 2,84	35,36 \pm 9,40	6,98 \pm 1,47	182,85 \pm 36,13	36,95 \pm 2,83	3,64 \pm 0,67	452,98 \pm 81,56
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	92,03-233,19	17,54-31,65	12,00-58,71	3,34-10,63	93,09-272,61	29,92-43,97	1,97-5,30	250,35-655,60
	N0a	84,62	0,00	8,34	0,00	29,18	0,00	0,00	122,14
	N0b	137,02	0,00	13,80	0,00	54,09	0,00	0,00	204,90
	N0c	119,79	0,00	14,06	0,00	50,83	0,00	0,00	184,69
	N0 ($\bar{O} \pm S$)	113,81 \pm 26,71	0,00 \pm 0,00	12,07 \pm 3,23	0,00 \pm 0,00	44,70 \pm 13,54	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	170,58 \pm 43,15
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	47,45-180,16	n.d.	4,04-20,09	n.d.	11,07-78,33	n.d.	n.d.	63,83-277,77
	N1a	328,57	10,15	68,57	16,89	212,14	25,28	8,63	670,23
	N1b	445,90	13,08	84,43	18,78	288,25	30,93	11,89	893,25
Woche 10	N1c	247,99	9,06	59,40	13,98	198,66	21,21	8,62	558,92
	N1 ($\bar{O} \pm S$)	340,82 \pm 99,52	10,76 \pm 2,08	70,80 \pm 12,66	16,55 \pm 2,42	233,02 \pm 48,31	25,81 \pm 4,88	9,71 \pm 1,88	707,47 \pm 170,25
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	93,57-588,07	5,61-15,92	39,34-102,26	10,54-22,56	113,01-353,03	13,68-37,93	5,03-14,39	284,50-1130,43
	N2a	199,62	7,93	46,14	11,51	169,32	20,32	8,33	463,18
	N2b	132,08	5,20	32,92	7,48	116,98	12,74	5,55	312,95
	N2c	340,63	10,68	89,90	19,88	247,60	27,54	12,24	748,47
	N2 ($\bar{O} \pm S$)	224,11 \pm 106,41	7,94 \pm 2,74	56,32 \pm 29,82	12,96 \pm 6,33	177,97 \pm 65,74	20,20 \pm 7,40	8,71 \pm 3,36	508,20 \pm 221,22
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	1,12-14,75	---	---	14,66-341,27	1,82-38,58	0,37-17,05	---
	N3a	97,95	4,08	35,02	9,69	105,74	14,07	5,00	271,55
	N3b	450,00	15,36	93,23	22,86	337,10	40,83	13,90	973,27
Woche 12	N3c	155,34	5,90	30,53	7,75	123,66	14,98	5,86	344,04
	N3 ($\bar{O} \pm S$)	234,43 \pm 188,88	8,45 \pm 6,05	52,93 \pm 34,97	13,43 \pm 8,22	188,83 \pm 128,71	23,29 \pm 15,19	8,26 \pm 4,91	529,62 \pm 385,92
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	---	---	---	---
	N4a	227,39	8,06	46,29	15,44	179,33	29,27	6,77	512,54
	N4b	118,75	4,06	33,24	9,15	108,80	13,63	4,88	292,50
	N4c	286,29	10,78	61,60	19,05	213,92	31,55	8,92	632,12
	N4 ($\bar{O} \pm S$)	210,81 \pm 84,99	7,63 \pm 3,38	47,04 \pm 14,20	14,54 \pm 5,01	167,35 \pm 53,58	24,82 \pm 9,76	6,86 \pm 2,02	479,06 \pm 172,27
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	11,78-82,31	2,10-26,99	34,24-300,46	0,58-49,05	1,84-11,88	51,09-907,03
	N5a	125,98	7,53	16,71	8,05	110,32	30,67	4,16	303,42
	N5b	373,40	15,09	51,20	19,84	244,80	52,84	9,32	766,49
Woche 14	N5c	222,13	9,99	33,78	14,74	158,28	34,79	6,17	479,88
	N5 ($\bar{O} \pm S$)	240,50 \pm 124,73	10,87 \pm 3,86	33,90 \pm 17,25	14,21 \pm 5,92	171,13 \pm 68,16	39,43 \pm 11,79	6,55 \pm 2,60	516,60 \pm 233,71
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	1,28-20,46	---	---	1,81-340,45	10,15-68,72	0,09-13,01	---

Tab. 22 Nitrat-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht $\pm S$ (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 0	N0	0,1321	0,1312	0,050	-0,0009	0,0025	32,67	29,33 \pm 5,47	15,76 – 42,91
	N1	0,1323	0,1313	0,050	-0,0010	0,0025	30,67		
	N2	0,1534	0,1519	0,050	-0,0015	0,0025	20,67		
	N3	0,1539	0,1528	0,050	-0,0011	0,0025	28,67		
	N4	0,1442	0,1430	0,050	-0,0012	0,0025	26,67		
Woche 1	N5	0,1308	0,1301	0,050	-0,0007	0,0025	36,67	210,67 \pm 12,86	178,72 – 242,61
	N0a	0,1291	0,1315	0,025	0,0024	0,0027	205,33		
	N0b	0,1275	0,1304	0,025	0,0029	0,0027	225,33		
	N0c	0,1491	0,1514	0,025	0,0023	0,0027	201,33		
	N1a	0,1285	0,1310	0,025	0,0025	0,0027	209,33		
	N1b	0,1485	0,1507	0,025	0,0022	0,0027	197,33	200,00 \pm 14,05	165,10 – 234,90
	N1c	0,1260	0,1282	0,025	0,0022	0,0027	197,33		
	N2a	0,1482	0,1501	0,025	0,0019	0,0027	185,33		
	N2b	0,1279	0,1305	0,025	0,0026	0,0027	213,33		
	N2c	0,1296	0,1319	0,025	0,0023	0,0027	201,33		
Woche 2	N3a	0,1508	0,1525	0,025	0,0017	0,0027	177,33	192,00 \pm 16,17	151,84 – 232,16
	N3b	0,1255	0,1280	0,025	0,0025	0,0027	209,33		
	N3c	0,1485	0,1505	0,025	0,0020	0,0027	189,33		

Fortsetzung Tab. 22 Nitrat-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 1	N4a	0,1274	0,1296	0,025	0,0022	0,0027	197,33	193,33 ± 6,93	176,12 – 210,55
	N4b	0,1283	0,1305	0,025	0,0022	0,0027	197,33		
	N4c	0,1526	0,1545	0,025	0,0019	0,0027	185,33		
	N5a	0,1347	0,1368	0,025	0,0021	0,0027	193,33	197,33 ± 6,93	180,12 – 214,55
	N5b	0,1442	0,1463	0,025	0,0021	0,0027	193,33		
	N5c	0,1312	0,1336	0,025	0,0024	0,0027	205,33		
Woche 2	N0a	0,1336	0,1369	0,025	0,0033	0,0023	222,67	233,33 ± 18,48	187,43 – 279,23
	N0b	0,1499	0,1532	0,025	0,0033	0,0023	222,67		
	N0c	0,1369	0,1410	0,025	0,0041	0,0023	254,67		
	N1a	0,1476	0,1530	0,025	0,0054	0,0023	306,67	324,00 ± 15,14	286,38 – 361,62
	N1b	0,1366	0,1427	0,025	0,0061	0,0023	334,67		
	N1c	0,1320	0,1380	0,025	0,0060	0,0023	330,67		
	N2a	0,1517	0,1582	0,025	0,0065	0,0023	350,67	364,00 ± 23,09	306,63 – 421,37
	N2b	0,1328	0,1403	0,025	0,0075	0,0023	390,67		
	N2c	0,1484	0,1549	0,025	0,0065	0,0023	350,67		
	N3a	0,1320	0,1395	0,025	0,0075	0,0023	390,67	392,00 ± 14,05	357,10 – 426,90
	N3b	0,1319	0,1398	0,025	0,0079	0,0023	406,67		
	N3c	0,1523	0,1595	0,025	0,0072	0,0023	378,67		
	N4a	0,1302	0,1398	0,025	0,0096	0,0023	474,67	397,33 ± 67,09	230,65 – 564,01
	N4b	0,1453	0,1519	0,025	0,0066	0,0023	354,67		
	N4c	0,1288	0,1356	0,025	0,0068	0,0023	362,67		
	N5a	0,1279	0,1342	0,025	0,0063	0,0023	342,67	346,67 ± 6,93	329,45 – 363,88
	N5b	0,1522	0,1585	0,025	0,0063	0,0023	342,67		
	N5c	0,1229	0,1295	0,025	0,0066	0,0023	354,67		
Woche 3	N0a	0,1354	0,1346	0,025	-0,0008	0,0021	50,67	46,67 ± 6,93	29,45 – 63,88
	N0b	0,1477	0,1466	0,025	-0,0011	0,0021	38,67		
	N0c	0,1353	0,1345	0,025	-0,0008	0,0021	50,67		
	N1a	0,1350	0,1389	0,025	0,0039	0,0021	238,67	233,33 ± 9,24	210,38 – 256,28
	N1b	0,1308	0,1347	0,025	0,0039	0,0021	238,67		
	N1c	0,1482	0,1517	0,025	0,0035	0,0021	222,67		
	N2a	0,1243	0,1290	0,025	0,0047	0,0021	270,67	281,33 ± 9,24	258,38 – 304,28
	N2b	0,1521	0,1572	0,025	0,0051	0,0021	286,67		
	N2c	0,1274	0,1325	0,025	0,0051	0,0021	286,67		
	N3a	0,1376	0,1430	0,025	0,0054	0,0021	298,67	297,33 ± 10,07	272,32 – 322,34
	N3b	0,1334	0,1390	0,025	0,0056	0,0021	306,67		
	N3c	0,1491	0,1542	0,025	0,0051	0,0021	286,67		
	N4a	0,1293	0,1347	0,025	0,0054	0,0021	298,67	288,00 ± 10,07	262,99 – 313,01
	N4b	0,1366	0,1417	0,025	0,0051	0,0021	286,67		
	N4c	0,1356	0,1405	0,025	0,0049	0,0021	278,67		
	N5a	0,1502	0,1550	0,025	0,0048	0,0021	274,67	288,00 ± 12,22	257,64 – 318,36
	N5b	0,1301	0,1355	0,025	0,0054	0,0021	298,67		
	N5c	0,1481	0,1533	0,025	0,0052	0,0021	290,67		
Woche 4	N0a	0,1502	0,1482	0,025	-0,0020	0,0024	16,00	28,00 ± 14,42	---
	N0b	0,1468	0,1450	0,025	-0,0018	0,0024	24,00		
	N0c	0,1290	0,1277	0,025	-0,0013	0,0024	44,00		
	N1a	0,1471	0,1529	0,025	0,0058	0,0024	328,00	382,67 ± 110,64	107,80 – 657,54
	N1b	0,1308	0,1386	0,020	0,0078	0,0024	510,00		
	N1c	0,1490	0,1528	0,020	0,0038	0,0024	310,00		
	N2a	0,1440	0,1492	0,020	0,0052	0,0024	380,00	391,67 ± 34,03	307,11 – 476,22
	N2b	0,1324	0,1386	0,020	0,0062	0,0024	430,00		
	N2c	0,1457	0,1506	0,020	0,0049	0,0024	365,00		
	N3a	0,1327	0,1386	0,020	0,0059	0,0024	415,00	415,00 ± 20,00	365,31 – 464,69
	N3b	0,1511	0,1574	0,020	0,0063	0,0024	435,00		
	N3c	0,1386	0,1441	0,020	0,0055	0,0024	395,00		
	N4a	0,1336	0,1395	0,020	0,0059	0,0024	415,00	403,33 ± 10,41	377,48 – 429,19
	N4b	0,1490	0,1546	0,020	0,0056	0,0024	400,00		
	N4c	0,1328	0,1383	0,020	0,0055	0,0024	395,00		
	N5a	0,1497	0,1550	0,020	0,0053	0,0024	385,00	408,33 ± 28,43	337,70 – 478,97
	N5b	0,1429	0,1485	0,020	0,0056	0,0024	400,00		
	N5c	0,1336	0,1400	0,020	0,0064	0,0024	440,00		
Woche 5	N0a	0,1325	0,1313	0,025	-0,0012	0,0023	44,00	42,67 ± 6,11	27,49 – 57,85
	N0b	0,1429	0,1415	0,025	-0,0014	0,0023	36,00		
	N0c	0,1302	0,1291	0,025	-0,0011	0,0023	48,00		
	N1a	0,1502	0,1546	0,025	0,0044	0,0023	268,00	274,67 ± 6,11	259,49 – 289,85
	N1b	0,1419	0,1466	0,025	0,0047	0,0023	280,00		
	N1c	0,1305	0,1351	0,025	0,0046	0,0023	276,00		
	N2a	0,1443	0,1483	0,025	0,0040	0,0023	252,00	276,00 ± 24,00	216,38 – 335,62
	N2b	0,1302	0,1354	0,025	0,0052	0,0023	300,00		
	N2c	0,1485	0,1531	0,025	0,0046	0,0023	276,00		
	N3a	0,1411	0,1450	0,025	0,0039	0,0023	248,00	276,00 ± 24,98	213,94 – 338,06
	N3b	0,1251	0,1302	0,025	0,0051	0,0023	296,00		
	N3c	0,1459	0,1507	0,025	0,0048	0,0023	284,00		
	N4a	0,1311	0,1360	0,025	0,0049	0,0023	288,00	274,67 ± 11,55	245,98 – 303,35
	N4b	0,1483	0,1527	0,025	0,0044	0,0023	268,00		
	N4c	0,1451	0,1495	0,025	0,0044	0,0023	268,00		
	N5a	0,1280	0,1329	0,025	0,0049	0,0023	288,00	281,33 ± 8,33	260,65 – 302,02
	N5b	0,1489	0,1534	0,025	0,0045	0,0023	272,00		
	N5c	0,1298	0,1346	0,025	0,0048	0,0023	284,00		
Woche 6	N0a	0,1488	0,1482	0,025	-0,0006	0,0020	54,67	70,67 ± 18,33	25,13 – 116,21
	N0b	0,1292	0,1295	0,025	0,0003	0,0020	90,67		
	N0c	0,1502	0,1499	0,025	-0,0003	0,0020	66,67		
	N1a	0,1340	0,1416	0,020	0,0076	0,0020	478,33	486,85 ± 21,32	433,89 – 539,81
	N1b	0,1519	0,1576	0,015	0,0057	0,0020	511,11		
	N1c	0,1496	0,1547	0,015	0,0051	0,0020	471,11		
	N2a	0,1306	0,1354	0,015	0,0048	0,0020	451,11	471,11 ± 24,04	411,40 – 530,83
	N2b	0,1459	0,1514	0,015	0,0055	0,0020	497,78		
	N2c	0,1338	0,1388	0,015	0,0050	0,0020	464,44		
	N3a	0,1520	0,1566	0,015	0,0046	0,0020	437,78	468,89 ± 30,06	394,21 – 543,57
	N3b	0,1510	0,1561	0,015	0,0051	0,0020	471,11		
	N3c	0,1328	0,1383	0,015	0,0055	0,0020	497,78		

Fortsetzung Tab. 22 Nitrat-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 6	N4a	0,1458	0,1512	0,015	0,0054	0,0020	491,11	
	N4b	0,1320	0,1372	0,015	0,0052	0,0020	477,78	482,22 ± 7,70
	N4c	0,1501	0,1553	0,015	0,0052	0,0020	477,78	463,10 – 501,35
	N5a	0,1528	0,1579	0,015	0,0051	0,0020	471,11	
	N5b	0,1330	0,1381	0,015	0,0051	0,0020	471,11	466,67 ± 7,70
	N5c	0,1467	0,1516	0,015	0,0049	0,0020	457,78	447,54 – 485,79

Tab. 23 Nitrat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87

Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665$ nm	$\lambda = 750$ nm	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 0	N0	15	1	0,061	0,012	0,39	
	N1	15	1	0,060	0,013	0,38	
	N2	15	1	0,064	0,014	0,40	
	N3	15	1	0,060	0,012	0,38	0,39 ± 0,01
	N4	15	1	0,062	0,015	0,38	0,36 – 0,42
Woche 1	N5	15	1	0,062	0,012	0,40	
	N0a	5	5	0,085	0,004	9,71	
	N0b	5	5	0,096	0,005	10,91	10,23 ± 0,62
	N0c	5	5	0,087	0,003	10,07	8,70 – 11,76
	N1a	5	5	0,085	0,004	9,71	
	N1b	5	5	0,084	0,004	9,59	8,99 ± 1,14
	N1c	5	5	0,068	0,004	7,67	6,15 – 11,83
	N2a	5	5	0,084	0,003	9,71	
	N2b	5	5	0,082	0,004	9,35	9,19 ± 0,62
	N2c	5	5	0,074	0,003	8,51	7,66 – 10,72
	N3a	5	5	0,077	0,004	8,75	
	N3b	5	5	0,081	0,004	9,23	8,59 ± 0,73
	N3c	5	5	0,068	0,003	7,79	6,77 – 10,41
	N4a	5	5	0,091	0,003	10,55	
	N4b	5	5	0,084	0,002	9,83	9,63 ± 1,03
	N4c	5	5	0,074	0,003	8,51	7,06 – 12,20
Woche 2	N5a	5	5	0,078	0,003	8,99	
	N5b	5	5	0,082	0,002	9,59	9,39 ± 0,35
	N5c	5	5	0,082	0,002	9,59	8,53 – 10,25
	N0a	5	1	0,272	0,005	6,40	
	N0b	5	1	0,292	0,006	6,86	6,97 ± 0,63
	N0c	5	1	0,322	0,003	7,65	5,40 – 8,54
	N1a	5	5	0,234	0,004	27,58	
	N1b	5	5	0,250	0,005	29,38	27,86 ± 1,40
	N1c	5	5	0,225	0,003	26,62	24,38 – 31,34
	N2a	5	5	0,222	0,005	26,02	
	N2b	5	5	0,260	0,005	30,58	27,38 ± 2,78
	N2c	5	5	0,214	0,001	25,54	20,47 – 34,28
	N3a	5	5	0,257	0,006	30,10	
	N3b	5	5	0,259	0,005	30,46	30,06 ± 0,42
	N3c	5	5	0,249	0,002	29,62	29,01 – 31,10
Woche 3	N4a	5	5	0,208	0,001	24,82	
	N4b	5	5	0,197	-0,001	23,74	23,78 ± 1,02
	N4c	5	5	0,188	-0,002	22,78	21,25 – 26,31
	N5a	5	5	0,178	0,001	21,22	
	N5b	5	5	0,212	0,000	25,42	23,50 ± 2,12
	N5c	5	5	0,196	-0,003	23,86	18,23 – 28,77
	N0a	5	1	0,031	0,004	0,65	
	N0b	5	1	0,033	0,004	0,70	0,69 ± 0,04
	N0c	5	1	0,031	0,001	0,72	0,60 – 0,78
	N1a	5	5	0,137	0,004	15,95	
	N1b	5	5	0,150	0,005	17,39	16,19 ± 1,10
	N1c	5	5	0,132	0,005	15,23	13,46 – 18,92
	N2a	5	5	0,124	0,005	14,27	
	N2b	5	5	0,142	0,002	16,79	15,99 ± 1,49
	N2c	5	5	0,144	0,003	16,91	12,29 – 19,69
Woche 4	N3a	5	5	0,185	0,006	21,46	
	N3b	5	5	0,191	0,004	22,42	21,94 ± 0,48
	N3c	5	5	0,187	0,004	21,94	20,75 – 23,13
	N4a	5	5	0,126	0,004	14,63	
	N4b	5	5	0,119	0,000	14,27	15,55 ± 1,91
	N4c	5	5	0,177	0,029	17,75	10,80 – 20,30
	N5a	5	5	0,129	0,004	14,99	
	N5b	5	5	0,132	0,000	15,83	15,87 ± 0,90
	N5c	5	5	0,140	0,000	16,79	13,63 – 18,10
	N0a	5	1	0,023	0,003	0,48	
	N0b	5	1	0,020	0,003	0,41	0,45 ± 0,04
	N0c	5	1	0,018	-0,001	0,46	0,36 – 0,54
	N1a	5	5	0,222	0,004	26,14	
	N1b	5	5	0,242	0,001	28,90	27,02 ± 1,63
	N1c	5	5	0,216	-0,001	26,02	22,97 – 31,06
Woche 4	N2a	5	5	0,231	0,003	27,34	
	N2b	5	5	0,282	0,001	33,69	29,70 ± 3,48
	N2c	5	5	0,233	-0,001	28,06	21,05 – 38,34
	N3a	5	5	0,254	0,003	30,10	
	N3b	5	5	0,275	0,001	32,85	31,02 ± 1,59
	N3c	5	5	0,250	-0,001	30,10	27,06 – 34,97
	N4a	5	5	0,231	-0,003	28,06	
	N4b	5	5	0,211	-0,003	25,66	26,58 ± 1,29
	N4c	5	5	0,214	-0,003	26,02	23,37 – 29,79
	N5a	5	5	0,199	-0,003	24,22	
	N5b	5	5	0,241	-0,003	29,26	28,22 ± 3,59
	N5c	5	5	0,256	-0,004	31,18	19,29 – 37,14

Fortsetzung Tab. 23 Nitrat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 5	N0a	5	1	0,023	0,004	0,46	0,54 ± 0,08	0,35 – 0,74
	N0b	5	1	0,027	0,003	0,58		
	N0c	5	1	0,027	0,002	0,60		
	N1a	5	5	0,114	0,003	13,31	14,07 ± 2,08	8,89 – 19,25
	N1b	5	5	0,140	0,003	16,43		
	N1c	5	5	0,104	0,000	12,47		
	N2a	5	5	0,116	0,003	13,55	14,23 ± 0,66	12,59 – 15,87
	N2b	5	5	0,127	0,003	14,87		
	N2c	5	5	0,121	0,002	14,27		
	N3a	5	5	0,112	0,003	13,07	13,63 ± 0,48	12,43 – 14,83
	N3b	5	5	0,120	0,004	13,91		
	N3c	5	5	0,117	0,001	13,91		
	N4a	5	5	0,105	0,000	12,59	12,79 ± 0,35	11,93 – 13,65
	N4b	5	5	0,110	0,000	13,19		
	N4c	5	5	0,104	-0,001	12,59		
	N5a	5	5	0,100	0,000	11,99	12,55 ± 0,54	11,21 – 13,89
	N5b	5	5	0,109	0,000	13,07		
	N5c	5	5	0,105	0,000	12,59		
Woche 6	N0a	5	1	0,045	0,007	0,91	0,98 ± 0,07	0,80 – 1,16
	N0b	5	1	0,047	0,006	0,98		
	N0c	5	1	0,050	0,006	1,06		
	N1a	5	5	0,213	0,005	24,94	26,06 ± 1,14	23,23 – 28,89
	N1b	5	5	0,233	0,006	27,22		
	N1c	5	5	0,222	0,005	26,02		
	N2a	5	5	0,278	0,006	32,61	30,66 ± 2,04	25,58 – 35,73
	N2b	5	5	0,262	0,005	30,82		
	N2c	5	5	0,243	0,005	28,54		
	N3a	5	5	0,233	0,010	26,74	28,06 ± 1,53	24,25 – 31,86
	N3b	5	5	0,238	0,007	27,70		
	N3c	5	5	0,256	0,008	29,74		
	N4a	5	5	0,275	0,006	32,25	29,50 ± 2,39	23,56 – 35,43
	N4b	5	5	0,239	0,005	28,06		
	N4c	5	5	0,241	0,006	28,18		
	N5a	5	5	0,251	0,006	29,38	28,58 ± 0,70	26,83 – 30,32
	N5b	5	5	0,241	0,005	28,30		
	N5c	5	5	0,241	0,007	28,06		

Tab. 24 Phosphat-Experiment: Trockengewichte von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 0	P1	0,1558	0,1583	0,050	0,0025	0,0024	97,33	99,83 ± 9,71	75,70 – 123,96
	P2	0,1662	0,1682	0,050	0,0020	0,0024	87,33		
	P3	0,1545	0,1574	0,050	0,0029	0,0024	105,33		
	P4	0,1493	0,1524	0,050	0,0031	0,0024	109,33		
Woche 1	P1a	0,1565	0,1622	0,025	0,0057	0,0020	309,33	364,59 ± 48,89	243,13 – 486,05
	P1b	0,1653	0,1690	0,015	0,0037	0,0020	382,22		
	P1c	0,1574	0,1614	0,015	0,0040	0,0020	402,22		
	P2a	0,1432	0,1471	0,015	0,0039	0,0020	395,56	393,33 ± 10,18	368,03 – 418,63
	P2b	0,1599	0,1636	0,015	0,0037	0,0020	382,22		
	P2c	0,1512	0,1552	0,015	0,0040	0,0020	402,22		
	P3a	0,1672	0,1707	0,015	0,0035	0,0020	368,89	371,11 ± 23,41	312,95 – 429,28
	P3b	0,1592	0,1631	0,015	0,0039	0,0020	395,56		
	P3c	0,1468	0,1500	0,015	0,0032	0,0020	348,89		
	P4a	0,1534	0,1575	0,015	0,0041	0,0020	408,89	413,33 ± 13,88	378,68 – 447,81
	P4b	0,1529	0,1573	0,015	0,0044	0,0020	428,89		
	P4c	0,1668	0,1708	0,015	0,0040	0,0020	402,22		
Woche 2	P1a	0,1631	0,1685	0,015	0,0054	0,0021	497,78	531,11 ± 30,55	455,21 – 607,01
	P1b	0,1620	0,1683	0,015	0,0063	0,0021	557,78		
	P1c	0,1695	0,1755	0,015	0,0060	0,0021	537,78		
	P2a	0,1696	0,1754	0,015	0,0058	0,0021	524,44	535,93 ± 18,00	491,22 – 580,63
	P2b	0,1563	0,1595	0,010	0,0032	0,0021	526,67		
	P2c	0,1585	0,1620	0,010	0,0035	0,0021	556,67		
	P3a	0,1623	0,1660	0,010	0,0037	0,0021	576,67	550,00 ± 46,19	435,25 – 664,75
	P3b	0,1662	0,1691	0,010	0,0029	0,0021	496,67		
	P3c	0,1654	0,1691	0,010	0,0037	0,0021	576,67		
	P4a	0,1591	0,1622	0,010	0,0031	0,0021	516,67	540,00 ± 25,17	477,48 – 602,52
	P4b	0,1591	0,1624	0,010	0,0033	0,0021	536,67		
	P4c	0,1597	0,1633	0,010	0,0036	0,0021	566,67		
Woche 3	P1a	0,1585	0,1660	0,025	0,0075	0,0015	361,33	370,81 ± 15,66	331,91 – 409,72
	P1b	0,1542	0,1585	0,015	0,0043	0,0015	388,89		
	P1c	0,1588	0,1627	0,015	0,0039	0,0015	362,22		
	P2a	0,1604	0,1618	0,015	0,0014	0,0015	195,56	291,11 ± 82,82	85,36 – 496,87
	P2b	0,1593	0,1628	0,015	0,0035	0,0015	335,56		
	P2c	0,1442	0,1478	0,015	0,0036	0,0015	342,22		
	P3a	0,1520	0,1553	0,015	0,0033	0,0015	322,22	337,78 ± 32,89	256,08 – 419,48
	P3b	0,1556	0,1597	0,015	0,0041	0,0015	375,56		
	P3c	0,1640	0,1672	0,015	0,0032	0,0015	315,56		
	P4a	0,1568	0,1602	0,015	0,0034	0,0015	328,89	333,33 ± 7,70	314,21 – 352,46
	P4b	0,1402	0,1438	0,015	0,0036	0,0015	342,22		
	P4c	0,1581	0,1615	0,015	0,0034	0,0015	328,89		
Woche 4	P1a	0,1274	0,1344	0,015	0,0070	0,0025	635,56	575,93 ± 54,44	440,69 – 711,17
	P1b	0,1291	0,1345	0,015	0,0054	0,0025	528,89		
	P1c	0,1309	0,1340	0,010	0,0031	0,0025	563,33		
	P2a	0,1514	0,1560	0,015	0,0046	0,0025	475,56	473,33 ± 30,06	398,65 – 548,02
	P2b	0,1477	0,1518	0,015	0,0041	0,0025	442,22		
	P2c	0,1221	0,1271	0,015	0,0050	0,0025	502,22		
	P3a	0,1500	0,1535	0,015	0,0035	0,0025	402,22	446,67 ± 46,83	330,34 – 563,00
	P3b	0,1264	0,1313	0,015	0,0049	0,0025	495,56		
	P3c	0,1313	0,1354	0,015	0,0041	0,0025	442,22		

Fortsetzung Tab. 24 Phosphat-Experiment: Trockengewichte von *M. aeruginosa* AB2005/31

Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
P4a	0,1500	0,1547	0,015	0,0047	0,0025	482,22	504,44 ± 19,25	456,63 – 552,26
P4b	0,1252	0,1304	0,015	0,0052	0,0025	515,56		
P4c	0,1513	0,1565	0,015	0,0052	0,0025	515,56		
P1a	0,1503	0,1549	0,025	0,0046	0,0023	276,00	287,00 ± 29,10	214,70 – 359,30
P1b	0,1243	0,1284	0,020	0,0041	0,0023	320,00		
P1c	0,1487	0,1517	0,020	0,0030	0,0023	265,00		
P2a	0,1247	0,1297	0,020	0,0050	0,0023	365,00	335,00 ± 39,69	236,41 – 433,59
P2b	0,1310	0,1357	0,020	0,0047	0,0023	350,00		
P2c	0,1502	0,1537	0,020	0,0035	0,0023	290,00		
P3a	0,1223	0,1278	0,025	0,0055	0,0023	312,00	241,33 ± 102,32	---
P3b	0,1482	0,1490	0,025	0,0008	0,0023	124,00		
P3c	0,1257	0,1306	0,025	0,0049	0,0023	288,00		
P4a	0,1296	0,1335	0,020	0,0039	0,0023	310,00	315,00 ± 13,23	282,14 – 347,86
P4b	0,1442	0,1480	0,020	0,0038	0,0023	305,00		
P4c	0,1251	0,1294	0,020	0,0043	0,0023	330,00		
P1a	0,1471	0,1528	0,020	0,0057	0,0023	401,67	457,59 ± 49,45	334,73 – 580,46
P1b	0,1275	0,1326	0,015	0,0051	0,0023	495,56		
P1c	0,1272	0,1320	0,015	0,0048	0,0023	475,56		
P2a	0,1514	0,1550	0,015	0,0036	0,0023	395,56	408,89 ± 13,33	375,76 – 442,01
P2b	0,1263	0,1303	0,015	0,0040	0,0023	422,22		
P2c	0,1554	0,1592	0,015	0,0038	0,0023	408,89		
P3a	0,1282	0,1351	0,020	0,0069	0,0023	461,67	371,67 ± 130,77	46,80 – 696,54
P3b	0,1274	0,1295	0,020	0,0021	0,0023	221,67		
P3c	0,1491	0,1554	0,020	0,0063	0,0023	431,67		
P4a	0,1261	0,1308	0,015	0,0047	0,0023	468,89	413,33 ± 50,92	286,84 – 539,83
P4b	0,1497	0,1529	0,015	0,0032	0,0023	368,89		
P4c	0,1278	0,1315	0,015	0,0037	0,0023	402,22		

Tab. 25 Phosphat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31

Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
P1	15	5	0,233	0,005	9,11	8,89 ± 0,63	7,32 – 10,46
P2	15	5	0,238	0,005	9,31		
P3	15	5	0,203	0,004	7,95		
P4	15	5	0,234	0,004	9,19		
P1a	5	5	0,215	0,011	24,46	24,58 ± 1,38	21,15 – 28,016
P1b	5	5	0,203	0,009	23,26		
P1c	5	5	0,225	0,008	26,02		
P2a	5	5	0,292	0,008	34,05	32,45 ± 5,34	19,19 – 45,71
P2b	5	5	0,314	0,007	36,81		
P2c	5	5	0,228	0,007	26,5		
P3a	5	5	0,307	0,007	35,97	35,09 ± 0,77	33,18 – 37,01
P3b	5	5	0,297	0,007	34,77		
P3c	5	5	0,293	0,005	34,53		
P4a	5	5	0,225	0,004	26,5	28,22 ± 2,38	22,30 – 34,13
P4b	5	5	0,230	0,003	27,22		
P4c	5	5	0,262	0,004	30,94		
P1a	5	5	0,212	0,004	24,94	23,42 ± 1,45	19,83 – 27,01
P1b	5	5	0,198	0,004	23,26		
P1c	5	5	0,187	0,003	22,06		
P2a	5	5	0,378	0,006	44,60	43,29 ± 2,08	38,12 – 48,45
P2b	5	5	0,376	0,006	44,36		
P2c	5	5	0,347	0,006	40,89		
P3a	5	5	0,491	0,005	58,27	50,96 ± 7,31	32,79 – 69,13
P3b	5	5	0,430	0,005	50,96		
P3c	5	5	0,365	0,001	43,65		
P4a	5	5	0,437	0,006	51,68	47,44 ± 8,08	27,38 – 67,51
P4b	5	5	0,320	0,002	38,13		
P4c	5	5	0,440	0,002	52,52		
P1a	5	5	0,166	0,003	19,54	18,90 ± 0,66	17,26 – 20,55
P1b	5	5	0,156	0,004	18,23		
P1c	5	5	0,162	0,004	18,94		
P2a	5	5	0,173	0,004	20,26	25,78 ± 4,85	13,73 – 37,83
P2b	5	5	0,249	0,004	29,38		
P2c	5	5	0,235	0,004	27,70		
P3a	5	5	0,273	0,004	32,25	32,01 ± 0,21	31,50 – 32,53
P3b	5	5	0,270	0,004	31,89		
P3c	5	5	0,270	0,004	31,89		
P4a	5	5	0,199	0,005	23,26	23,18 ± 0,60	21,68 – 24,68
P4b	5	5	0,194	0,006	22,54		
P4c	5	5	0,202	0,004	23,74		
P1a	5	5	0,159	0,005	18,47	17,79 ± 1,50	14,06 – 21,51
P1b	5	5	0,161	0,004	18,82		
P1c	5	5	0,138	0,004	16,07		
P2a	5	5	0,209	0,007	24,22	24,78 ± 1,29	21,57 – 27,99
P2b	5	5	0,226	0,007	26,26		
P2c	5	5	0,206	0,007	23,86		
P3a	5	5	0,163	0,005	18,94	28,38 ± 9,53	4,69 – 52,06
P3b	5	5	0,322	0,005	38,01		
P3c	5	5	0,239	0,004	28,18		
P4a	5	5	0,232	0,008	26,86	29,10 ± 1,94	24,27 – 33,92
P4b	5	5	0,259	0,006	30,34		
P4c	5	5	0,257	0,006	30,10		
P1a	5	5	0,111	0,003	12,95	11,67 ± 2,32	5,91 – 17,43
P1b	5	5	0,079	0,004	8,99		
P1c	5	5	0,111	0,002	13,07		
P2a	5	5	0,222	0,006	25,9	24,78 ± 1,00	22,30 – 27,26
P2b	5	5	0,209	0,005	24,46		
P2c	5	5	0,204	0,004	23,98		

Fortsetzung Tab. 25 Phosphat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 5	P3a	5	5	0,091	0,005	10,31	10,27 ± 0,66	8,63 – 11,91
	P3b	5	5	0,085	0,005	9,59		
	P3c	5	5	0,092	0,001	10,91		
	P4a	5	5	0,109	0,005	12,47	14,51 ± 2,32	8,76 – 20,26
	P4b	5	5	0,146	0,004	17,03		
	P4c	5	5	0,118	0,001	14,03		
Woche 6	P1a	5	5	0,139	0,002	16,43	15,71 ± 0,67	14,05 – 17,37
	P1b	5	5	0,129	-0,001	15,59		
	P1c	5	5	0,125	-0,001	15,11		
	P2a	5	5	0,206	0,004	24,22	23,58 ± 1,65	19,47 – 27,69
	P2b	5	5	0,185	0,004	21,70		
	P2c	5	5	0,208	0,001	24,82		
	P3a	5	5	0,259	0,001	30,94	24,54 ± 12,02	---
	P3b	5	5	0,089	0,000	10,67		
	P3c	5	5	0,266	-0,001	32,01		
	P4a	5	5	0,253	0,004	29,86	27,58 ± 2,97	20,20 – 34,95
	P4b	5	5	0,206	0,004	24,22		
	P4c	5	5	0,239	0,000	28,66		

Tab. 26 Phosphat-Experiment: Microcystingehalte (µg g⁻¹) von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	MC-RR	dm-MC-RR	MC-LA	dm-MC-LA	MC-LR	dm-MC-LR	MC-YR	Σ MCs
Woche 2	P (Woche 0)	385,56	33,32	56,34	8,20	524,65	83,12	6,62	1097,81
	P1a	510,69	29,33	62,47	7,51	676,96	102,36	6,31	1395,62
	P1b	575,12	33,58	64,16	7,55	692,12	108,51	6,81	1487,85
	P1c	429,27	26,09	53,05	6,46	567,07	109,35	5,72	1197,00
	P1 (0 ± S)	505,03 ± 73,09	29,67 ± 3,76	59,89 ± 5,99	7,17 ± 0,62	645,38 ± 68,24	106,74 ± 3,82	6,28 ± 0,55	1360,16 ± 148,63
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	323,44-686,61	20,33-39,00	45,02-74,77	5,63-8,71	475,85-814,92	97,26-116,22	4,92-7,64	990,91-1729,41
	P2a	461,22	42,07	71,84	12,92	704,08	168,11	8,45	1468,68
	P2b	415,63	41,12	72,06	12,29	588,24	132,22	8,18	1269,72
	P2c	420,85	42,24	72,97	14,24	594,59	167,11	7,51	1319,53
	P2 (0 ± S)	432,57 ± 24,96	41,81 ± 0,61	72,29 ± 0,6	13,15 ± 1,00	628,97 ± 65,13	155,81 ± 20,44	8,05 ± 0,48	1352,64 ± 103,53
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	370,57-494,56	40,30-43,32	70,79-73,79	10,67-15,63	467,18-790,77	105,03-206,59	6,84-9,25	1095,43-1609,86
	P3a	450,19	45,41	80,65	15,93	649,43	168,6	8,91	1419,12
	P3b	386,19	46,98	73,88	16,30	647,39	179,78	7,87	1358,40
	P3c	388,31	57,74	71,21	17,80	786,29	254,88	9,96	1586,19
	P3 (0 ± S)	408,23 ± 36,35	50,05 ± 6,71	75,25 ± 4,87	16,68 ± 0,99	694,37 ± 79,61	201,09 ± 46,92	8,91 ± 1,04	1454,57 ± 117,96
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	317,91-498,55	33,38-66,71	63,16-87,34	14,21-19,15	496,58-892,16	84,52-317,65	6,32-11,51	1161,51-1747,62
Woche 4	P4a	176,76	19,03	50,61	9,94	383,79	79,3	3,91	723,35
	P4b	298,93	27,65	70,09	12,83	496,93	95,56	5,41	1007,40
	P4c	235,96	23,03	57,16	11,72	419,59	90,07	4,11	841,65
	P4 (0 ± S)	237,22 ± 61,09	23,24 ± 4,31	59,29 ± 9,91	11,5 ± 1,46	433,44 ± 57,83	88,31 ± 8,27	4,48 ± 0,82	857,47 ± 112,68
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	85,44-388,99	12,53-33,95	34,66-83,92	7,87-15,13	289,78-577,10	67,77-108,85	2,45-6,51	502,99-1211,95
	P1a	700,68	42,93	111,56	14,83	758,50	120,70	9,58	1758,78
	P1b	710,53	50,10	110,77	14,91	917,46	137,28	9,72	1950,76
	P1c	649,01	46,95	101,55	12,36	827,81	103,14	8,62	1749,43
	P1 (0 ± S)	686,74 ± 33,04	46,66 ± 3,59	107,96 ± 5,57	14,03 ± 1,45	834,59 ± 79,7	120,37 ± 17,07	9,31 ± 0,6	1819,66 ± 113,63
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	604,64-768,83	37,74-55,58	94,12-121,79	10,43-17,63	636,60-1032,59	77,96-162,78	7,82-10,80	1537,35-2101,96
	P2a	290,59	29,12	47,21	8,69	433,80	115,99	5,09	930,49
	P2b	236,98	23,72	45,40	8,49	377,78	103,57	4,21	800,14
	P2c	197,95	22,82	46,42	9,03	337,37	103,98	3,78	721,35
	P2 (0 ± S)	241,84 ± 46,51	25,22 ± 3,41	46,34 ± 0,91	8,74 ± 0,27	382,98 ± 48,42	107,85 ± 7,05	4,36 ± 0,67	817,33 ± 105,62
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	126,29-357,39	16,75-33,69	44,08-48,60	8,07-9,41	262,68-503,28	90,32-125,37	2,71-6,01	554,92-1079,73
	P3a	479,40	30,11	98,50	13,22	732,21	104,85	8,95	1467,24
Woche 6	P3b	213,22	24,04	52,03	9,45	386,44	107,53	4,24	796,95
	P3c	337,20	29,25	88,93	14,29	617,65	113,78	6,96	1208,05
	P3 (0 ± S)	343,27 ± 133,19	27,80 ± 3,29	79,82 ± 24,54	12,32 ± 2,55	578,77 ± 176,13	108,72 ± 4,58	6,71 ± 2,37	1157,41 ± 338
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	12,37-674,17	19,64-35,96	18,87-140,78	6,00-18,64	141,19-1016,34	97,35-120,09	0,84-12,59	317,70-1997,13
	P4a	248,71	19,55	50,32	7,22	330,23	47,86	4,50	708,39
	P4b	196,09	15,2	29,23	5,62	230,61	43,29	3,21	523,26
	P4c	294,98	23,18	55,02	8,33	384,63	56,18	4,64	826,97
	P4 (0 ± S)	246,60 ± 49,48	19,31 ± 3,99	44,86 ± 13,73	7,06 ± 1,37	315,16 ± 78,11	49,11 ± 6,53	4,12 ± 0,79	686,21 ± 153,06
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	123,67-369,52	9,39-29,24	10,74-78,97	3,66-10,45	121,11-509,20	32,88-65,34	2,16-6,08	305,95-1066,46
	P1a	684,51	40,75	107,32	12,28	857,75	105,87	9,25	1817,74
	P1b	580,69	40,54	106,48	11,34	707,67	94,80	8,19	1549,71
	P1c	794,59	45,39	117,97	13,26	897,30	110,21	9,96	1988,69
	P1 (0 ± S)	686,6 ± 106,97	42,23 ± 2,74	110,59 ± 6,41	12,29 ± 0,96	820,91 ± 100,04	103,63 ± 7,95	9,13 ± 0,89	1785,38 ± 221,27
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	420,85-952,34	35,42-49,04	94,68-126,51	9,91-14,67	572,38-1069,43	83,88-123,38	6,92-11,35	1235,67-2335,09
	P2a	221,55	20,74	49,67	9,68	353,78	61,49	4,38	721,29
	P2b	203,93	18,98	49,84	10,91	309,67	60,03	4,15	657,52
	P2c	130,78	15,14	41,56	8,91	250,31	49,71	3,47	499,89
Woche 6	P2 (0 ± S)	185,42 ± 48,13	18,29 ± 2,86	47,02 ± 4,73	9,83 ± 1,01	304,59 ± 51,92	57,08 ± 6,42	4,00 ± 0,47	626,23 ± 113,97
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	65,85-305,00	11,18-25,40	35,27-58,77	7,32-12,34	175,60-433,58	41,13-73,03	2,83-5,17	343,10-909,36
	P3a	310,32	18,03	160,18	16,24	730,09	79,95	6,52	1321,33
	P3b	287,30	20,87	154,76	14,19	495,24	38,21	8,47	1019,04
	P3c	222,26	18,13	105,85	17,55	445,29	68,25	3,98	881,33
	P3 (0 ± S)	273,30 ± 45,67	19,01 ± 1,61	140,26 ± 29,92	16,00 ± 1,69	556,87 ± 152,07	62,14 ± 21,53	6,32 ± 2,25	1073,90 ± 225,07
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	159,84-386,76	15,02-23,01	65,92-214,60	11,79-20,20	179,07-934,67	8,65-115,63	0,74-11,91	514,74-1633,06
	P4a	146,79	14,32	43,27	8,00	256,09	51,02	3,51	523,00
	P4b	78,48	6,60	17,25	2,78	99,17	20,33	1,69	226,31
	P4c	147,57	13,09	33,47	6,09	198,51	46,26	2,74	447,73
Woche 6	P4 (0 ± S)	124,28 ± 39,67	11,34 ± 4,14	31,33 ± 13,14	5,63 ± 2,64	184,59 ± 79,38	39,20 ± 16,51	2,65 ± 0,91	399,01 ± 154,23
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	25,73-222,84	1,04-21,63	---	---	---	---	0,38-4,92	15,86-782,17

Tab. 27 Phosphat-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 0	P1	0,1494	0,1505	0,050	0,0011	0,0024	69,33	69,83 ± 1,00	67,35 – 72,32
	P2	0,1545	0,1556	0,050	0,0011	0,0024	69,33		
	P3	0,1685	0,1697	0,050	0,0012	0,0024	71,33		
	P4	0,1576	0,1587	0,050	0,0011	0,0024	69,33		
Woche 1	P1a	0,1625	0,1684	0,025	0,0059	0,0020	317,33	312,00 ± 12,86	280,06 – 343,94
	P1b	0,1594	0,1654	0,025	0,0060	0,0020	321,33		
	P1c	0,1613	0,1667	0,025	0,0054	0,0020	297,33		
	P2a	0,1708	0,1759	0,025	0,0051	0,0020	285,33	305,33 ± 22,27	250,00 – 360,66
	P2b	0,1644	0,1706	0,025	0,0062	0,0020	329,33		
	P2c	0,1563	0,1618	0,025	0,0055	0,0020	301,33		
	P3a	0,1629	0,1680	0,025	0,0051	0,0020	285,33	289,33 ± 4,00	279,40 – 299,27
	P3b	0,1663	0,1715	0,025	0,0052	0,0020	289,33		
	P3c	0,1736	0,1789	0,025	0,0053	0,0020	293,33		
	P4a	0,1608	0,1662	0,025	0,0054	0,0020	297,33	290,67 ± 6,11	275,49 – 305,85
	P4b	0,1568	0,1619	0,025	0,0051	0,0020	285,33		
	P4c	0,1700	0,1752	0,025	0,0052	0,0020	289,33		
Woche 2	P1a	0,1616	0,1705	0,025	0,0089	0,0021	438,67	438,44 ± 20,00	388,76 – 488,13
	P1b	0,1561	0,1632	0,020	0,0071	0,0021	458,33		
	P1c	0,1588	0,1651	0,020	0,0063	0,0021	418,33		
	P2a	0,1684	0,1763	0,020	0,0079	0,0021	498,33	475,00 ± 20,82	423,28 – 526,72
	P2b	0,1666	0,1737	0,020	0,0071	0,0021	458,33		
	P2c	0,1569	0,1642	0,020	0,0073	0,0021	468,33		
	P3a	0,1583	0,1662	0,020	0,0079	0,0021	498,33	475,00 ± 20,82	423,28 – 526,72
	P3b	0,1590	0,1663	0,020	0,0073	0,0021	468,33		
	P3c	0,1595	0,1666	0,020	0,0071	0,0021	458,33		
	P4a	0,1638	0,1722	0,020	0,0084	0,0021	523,33	506,67 ± 24,66	413,73 – 536,27
	P4b	0,1532	0,1615	0,020	0,0083	0,0021	518,33		
	P4c	0,1493	0,1568	0,020	0,0075	0,0021	478,33		
Woche 3	P1a	0,1572	0,1615	0,025	0,0043	0,0015	233,33	245,33 ± 14,42	209,50 – 281,16
	P1b	0,1517	0,1567	0,025	0,0050	0,0015	261,33		
	P1c	0,1556	0,1601	0,025	0,0045	0,0015	241,33		
	P2a	0,1541	0,1584	0,025	0,0043	0,0015	233,33	224,00 ± 10,07	198,99 – 249,01
	P2b	0,1650	0,1688	0,025	0,0038	0,0015	213,33		
	P2c	0,1568	0,1609	0,025	0,0041	0,0015	225,33		
	P3a	0,1452	0,1503	0,025	0,0051	0,0015	265,33	245,33 ± 20,00	195,65 – 295,02
	P3b	0,1633	0,1679	0,025	0,0046	0,0015	245,33		
	P3c	0,1574	0,1615	0,025	0,0041	0,0015	225,33		
	P4a	0,1637	0,1677	0,025	0,0040	0,0015	221,33	230,67 ± 12,86	198,72 – 262,61
	P4b	0,1569	0,1610	0,025	0,0041	0,0015	225,33		
	P4c	0,1505	0,1551	0,025	0,0046	0,0015	245,33		
Woche 4	P1a	0,1261	0,1328	0,025	0,0067	0,0025	369,33	380,00 ± 12,22	349,64 – 410,36
	P1b	0,1470	0,1539	0,025	0,0069	0,0025	377,33		
	P1c	0,1220	0,1293	0,025	0,0073	0,0025	393,33		
	P2a	0,1518	0,1591	0,025	0,0073	0,0025	393,33	356,00 ± 32,58	275,06 – 436,94
	P2b	0,1271	0,1331	0,025	0,0060	0,0025	341,33		
	P2c	0,1268	0,1326	0,025	0,0058	0,0025	333,33		
	P3a	0,1471	0,1524	0,025	0,0053	0,0025	313,33	336,00 ± 32,58	255,06 – 416,94
	P3b	0,1263	0,1331	0,025	0,0068	0,0025	373,33		
	P3c	0,1495	0,1550	0,025	0,0055	0,0025	321,33		
	P4a	0,1271	0,1329	0,025	0,0058	0,0025	333,33	306,67 ± 33,31	223,92 – 389,41
	P4b	0,1263	0,1317	0,025	0,0054	0,0025	317,33		
	P4c	0,1479	0,1521	0,025	0,0042	0,0025	269,33		
Woche 5	P1a	0,1321	0,1351	0,025	0,0030	0,0023	212,00	210,67 ± 18,04	165,86 – 255,48
	P1b	0,1429	0,1454	0,025	0,0025	0,0023	192,00		
	P1c	0,1329	0,1363	0,025	0,0034	0,0023	228,00		
	P2a	0,1515	0,1544	0,025	0,0029	0,0023	208,00	224,00 ± 16,00	184,25 – 263,75
	P2b	0,1328	0,1365	0,025	0,0037	0,0023	240,00		
	P2c	0,1339	0,1372	0,025	0,0033	0,0023	224,00		
	P3a	0,1447	0,1475	0,025	0,0028	0,0023	204,00	194,67 ± 19,73	145,65 – 243,69
	P3b	0,1330	0,1359	0,025	0,0029	0,0023	208,00		
	P3c	0,1490	0,1510	0,025	0,0020	0,0023	172,00		
	P4a	0,1351	0,1386	0,025	0,0035	0,0023	232,00	208,00 ± 26,23	142,84 – 273,16
	P4b	0,1332	0,1362	0,025	0,0030	0,0023	212,00		
	P4c	0,1476	0,1498	0,025	0,0022	0,0023	180,00		
Woche 6	P1a	0,1201	0,1252	0,025	0,0051	0,0023	297,33	298,67 ± 2,31	292,93 – 304,40
	P1b	0,1506	0,1558	0,025	0,0052	0,0023	301,33		
	P1c	0,1304	0,1355	0,025	0,0051	0,0023	297,33		
	P2a	0,1246	0,1285	0,025	0,0039	0,0023	249,33	293,33 ± 48,50	172,85 – 413,82
	P2b	0,1520	0,1568	0,025	0,0048	0,0023	285,33		
	P2c	0,1249	0,1312	0,025	0,0063	0,0023	345,33		
	P3a	0,1471	0,1511	0,025	0,0040	0,0023	253,33	244,00 ± 16,17	203,84 – 284,16
	P3b	0,1317	0,1357	0,025	0,0040	0,0023	253,33		
	P3c	0,1306	0,1339	0,025	0,0033	0,0023	225,33		
	P4a	0,1521	0,1567	0,025	0,0046	0,0023	277,33	281,33 ± 26,23	216,17 – 346,50
	P4b	0,1270	0,1311	0,025	0,0041	0,0023	257,33		
	P4c	0,1449	0,1503	0,025	0,0054	0,0023	309,33		

Tab. 28 Phosphat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665$ nm	$\lambda = 750$ nm	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 0	P1	15	5	0,250	-0,002	10,07	10,87 ± 1,22	7,85 – 13,90
	P2	15	5	0,242	-0,002	9,75		
	P3	15	5	0,308	-0,003	12,43		
	P4	15	5	0,279	-0,002	11,23		
	P1a	5	5	0,344	0,009	40,17	40,89 ± 0,86	38,74 – 43,04
	P1b	5	5	0,347	0,008	40,65		
	P1c	5	5	0,359	0,010	41,85		

Fortsetzung Tab. 28 Phosphat-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 1	P2a	5	5	0,406	0,010	47,48	46,40 ± 2,74	39,59 – 53,22
	P2b	5	5	0,412	0,008	48,44		
	P2c	5	5	0,369	0,008	43,29		
	P3a	5	5	0,468	0,009	55,04	53,80 ± 2,25	48,21 – 59,39
	P3b	5	5	0,436	0,009	51,20		
	P3c	5	5	0,467	0,007	55,16		
	P4a	5	5	0,429	0,008	50,48	48,00 ± 2,18	42,60 – 53,41
	P4b	5	5	0,400	0,007	47,12		
	P4c	5	5	0,394	0,007	46,40		
Woche 2	P1a	5	5	0,458	0,000	54,92	51,00 ± 3,78	41,60 – 60,40
	P1b	5	5	0,392	-0,003	47,36		
	P1c	5	5	0,420	-0,003	50,72		
	P2a	5	5	0,482	0,000	57,79	55,20 ± 2,52	48,93 – 61,46
	P2b	5	5	0,457	-0,002	55,04		
	P2c	5	5	0,437	-0,003	52,76		
	P3a	5	5	0,549	0,000	65,83	58,43 ± 6,44	42,44 – 74,43
	P3b	5	5	0,460	-0,002	55,40		
	P3c	5	5	0,447	-0,004	54,08		
Woche 3	P4a	5	5	0,467	-0,002	56,24	57,71 ± 7,37	39,41 – 76,01
	P4b	5	5	0,545	-0,003	65,71		
	P4c	5	5	0,423	-0,004	51,20		
	P1a	5	5	0,182	0,002	21,58	22,34 ± 2,43	16,31 – 28,38
	P1b	5	5	0,172	0,002	20,38		
	P1c	5	5	0,211	0,002	25,06		
	P2a	5	5	0,294	0,004	34,77	35,37 ± 1,47	31,71 – 39,09
	P2b	5	5	0,290	0,004	34,29		
	P2c	5	5	0,313	0,004	37,05		
Woche 4	P3a	5	5	0,291	0,002	34,65	35,53 ± 0,84	33,44 – 37,62
	P3b	5	5	0,307	0,004	36,33		
	P3c	5	5	0,301	0,004	35,61		
	P4a	5	5	0,255	0,004	30,10	33,73 ± 3,15	25,90 – 41,57
	P4b	5	5	0,299	0,004	35,37		
	P4c	5	5	0,301	0,003	35,73		
	P1a	5	5	0,105	0,003	12,23	14,75 ± 4,36	3,91 – 25,58
	P1b	5	5	0,105	0,003	12,23		
	P1c	5	5	0,168	0,003	19,78		
Woche 5	P2a	5	5	0,546	0,008	64,51	61,67 ± 7,66	42,64 – 80,70
	P2b	5	5	0,569	0,006	67,51		
	P2c	5	5	0,447	0,005	53,00		
	P3a	5	5	0,321	0,005	37,89	44,44 ± 6,60	28,06 – 60,83
	P3b	5	5	0,434	0,008	51,08		
	P3c	5	5	0,375	0,005	44,36		
	P4a	5	5	0,374	0,008	43,88	42,77 ± 1,08	40,08 – 45,45
	P4b	5	5	0,356	0,008	41,73		
	P4c	5	5	0,361	0,005	42,69		
Woche 6	P1a	5	5	0,144	-0,003	17,63	16,99 ± 0,82	14,96 – 19,01
	P1b	5	5	0,132	-0,002	16,07		
	P1c	5	5	0,140	-0,004	17,27		
	P2a	5	5	0,230	0,003	27,22	27,34 ± 0,32	26,55 – 28,13
	P2b	5	5	0,225	-0,001	27,10		
	P2c	5	5	0,229	-0,002	27,70		
	P3a	5	5	0,251	0,000	30,10	31,53 ± 6,71	14,86 – 48,21
	P3b	5	5	0,213	-0,001	25,66		
	P3c	5	5	0,318	-0,006	38,85		
Woche 7	P4a	5	5	0,259	0,000	31,06	28,26 ± 2,95	20,93 – 35,58
	P4b	5	5	0,236	-0,002	28,54		
	P4c	5	5	0,207	-0,003	25,18		
	P1a	5	5	0,152	0,009	17,15	14,63 ± 4,36	3,79 – 25,46
	P1b	5	5	0,152	0,009	17,15		
	P1c	5	5	0,088	0,008	9,59		
	P2a	5	5	0,315	0,012	36,33	41,73 ± 5,86	27,17 – 56,29
	P2b	5	5	0,353	0,012	40,89		
	P2c	5	5	0,412	0,012	47,96		
Woche 8	P3a	5	5	0,414	0,012	48,20	45,80 ± 2,67	39,17 – 52,44
	P3b	5	5	0,398	0,012	46,28		
	P3c	5	5	0,370	0,012	42,93		
	P4a	5	5	0,354	0,011	41,13	35,77 ± 6,67	19,20 – 52,35
	P4b	5	5	0,327	0,011	37,89		
	P4c	5	5	0,243	0,007	28,30		

Tab. 29 pH-Experiment: Trockengewichte von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W0	pH7,5	0,1297	0,1310	0,050	0,0013	0,0021	67,33	69,33 ± 9,17	45,56 – 92,10
	pH9,5	0,1474	0,1484	0,050	0,0010	0,0021	61,33		
	pH10,5	0,1349	0,1368	0,050	0,0019	0,0021	79,33		
Woche 1	pH7,5a	0,1350	0,1402	0,025	0,0052	0,0024	302,67	292,00 ± 9,24	269,05 – 314,95
	pH7,5b	0,1500	0,1548	0,025	0,0048	0,0024	286,67		
	pH7,5c	0,1329	0,1377	0,025	0,0048	0,0024	286,67		
	pH9,5a	0,1512	0,1563	0,025	0,0051	0,0024	298,67	310,67 ± 12,00	280,85 – 340,48
	pH9,5b	0,1243	0,1300	0,025	0,0057	0,0024	322,67		
	pH9,5c	0,1350	0,1404	0,025	0,0054	0,0024	310,67		
	pH10,5a	0,1390	0,1441	0,025	0,0051	0,0024	298,67	298,67 ± 0,00	298,67 – 298,67
	pH10,5b	0,1458	0,1509	0,025	0,0051	0,0024	298,67		
	pH10,5c	0,1353	0,1404	0,025	0,0051	0,0024	298,67		
Woche 2	pH7,5a	0,1456	0,1495	0,025	0,0039	0,0021	238,67	254,67 ± 14,42	218,84 – 290,50
	pH7,5b	0,1487	0,1533	0,025	0,0046	0,0021	266,67		
	pH7,5c	0,1300	0,1344	0,025	0,0044	0,0021	258,67		
	pH9,5a	0,1372	0,1462	0,025	0,0090	0,0021	442,67	440,00 ± 28,10	370,20 – 509,80
	pH9,5b	0,1471	0,1553	0,025	0,0082	0,0021	410,67		
	pH9,5c	0,1351	0,1447	0,025	0,0096	0,0021	466,67		

Fortsetzung Tab. 29 pH-Experiment: Trockengewichte von *M. aeruginosa* AB2005/31

Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
pH10,5a	0,1347	0,1424	0,025	0,0077	0,0021	390,67		
pH10,5b	0,1522	0,1607	0,025	0,0085	0,0021	422,67	402,67 ± 17,44	359,35 – 445,98
pH10,5c	0,1485	0,1563	0,025	0,0078	0,0021	394,67		
Woche 3	pH7,5a	0,1547	0,1533	0,025	-0,0014	0,0019	20,00	
	pH7,5b	0,1405	0,1396	0,025	-0,0009	0,0019	40,00	30,67 ± 10,07
	pH7,5c	0,1315	0,1304	0,025	-0,0011	0,0019	32,00	5,66 – 55,68
	pH9,5a	0,1339	0,1363	0,025	0,0024	0,0019	172,00	
	pH9,5b	0,1523	0,1545	0,025	0,0022	0,0019	164,00	188,00 ± 34,87
	pH9,5c	0,1461	0,1499	0,025	0,0038	0,0019	228,00	101,37 – 274,63
	pH10,5a	0,1466	0,1522	0,025	0,0056	0,0019	300,00	
	pH10,5b	0,1535	0,1581	0,025	0,0046	0,0019	260,00	280,00 ± 20,00
	pH10,5c	0,1557	0,1608	0,025	0,0051	0,0019	280,00	230,31 – 329,69
Woche 4	pH7,5a	0,1342	0,1324	0,025	-0,0018	0,0028	38,67	
	pH7,5b	0,1526	0,1504	0,025	-0,0022	0,0028	22,67	30,67 ± 8,00
	pH7,5c	0,1530	0,1510	0,025	-0,0020	0,0028	30,67	10,79 – 50,54
	pH9,5a	0,1461	0,1500	0,025	0,0039	0,0028	266,67	
	pH9,5b	0,1456	0,1513	0,025	0,0057	0,0028	338,67	301,33 ± 36,07
	pH9,5c	0,1516	0,1563	0,025	0,0047	0,0028	298,67	211,71 – 390,95
	pH10,5a	0,1524	0,1577	0,025	0,0053	0,0028	322,67	
	pH10,5b	0,1306	0,1372	0,025	0,0066	0,0028	374,67	357,33 ± 30,02
	pH10,5c	0,1334	0,1400	0,025	0,0066	0,0028	374,67	282,75 – 431,92
Woche 5	pH7,5a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0026	n.d.	
	pH7,5b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0026	n.d.	n.d.
	pH7,5c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0026	n.d.	
	pH9,5a	0,1321	0,1356	0,025	0,0035	0,0026	242,67	
	pH9,5b	0,1319	0,1356	0,025	0,0037	0,0026	250,67	228,00 ± 32,58
	pH9,5c	0,1544	0,1566	0,025	0,0022	0,0026	190,67	147,06 – 308,94
	pH10,5a	0,1443	0,1491	0,025	0,0048	0,0026	294,67	
	pH10,5b	0,1323	0,1378	0,025	0,0055	0,0026	322,67	316,00 ± 18,90
	pH10,5c	0,1288	0,1345	0,025	0,0057	0,0026	330,67	269,04 – 362,96
Woche 6	pH7,5a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0020	n.d.	
	pH7,5b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0020	n.d.	n.d.
	pH7,5c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0020	n.d.	
	pH9,5a	0,1485	0,1541	0,020	0,0056	0,0020	378,33	
	pH9,5b	0,1235	0,1283	0,020	0,0048	0,0020	338,33	323,33 ± 63,84
	pH9,5c	0,1491	0,1522	0,020	0,0031	0,0020	253,33	164,74 – 481,92
	pH10,5a	0,1439	0,1510	0,020	0,0071	0,0020	453,33	
	pH10,5b	0,1477	0,1549	0,020	0,0072	0,0020	458,33	488,33 ± 56,35
	pH10,5c	0,1313	0,1404	0,020	0,0091	0,0020	553,33	348,35 – 628,32

Tab. 30 pH-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665$ nm	$\lambda = 750$ nm	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05 / \alpha = 0,01$ (t-Verteilung)
W0	pH7,5	15	5	0,061	-0,005	2,64		
	pH9,5	15	5	0,060	-0,004	2,56	2,96 ± 0,62	1,41 – 4,51
	pH10,5	15	5	0,091	-0,001	3,68		
Woche 1	pH7,5a	5	5	0,082	-0,002	10,07		
	pH7,5b	5	5	0,065	-0,004	8,27	9,11 ± 0,91	6,86 – 11,36
	pH7,5c	5	5	0,071	-0,004	8,99		
	pH9,5a	5	5	0,110	0,001	13,07		
	pH9,5b	5	5	0,118	0,002	13,91	13,55 ± 0,43	12,48 – 14,62
	pH9,5c	5	5	0,114	0,000	13,67		
	pH10,5a	5	5	0,113	-0,002	13,79		
	pH10,5b	5	5	0,117	-0,003	14,39	14,23 ± 0,39	13,27 – 15,19
	pH10,5c	5	5	0,117	-0,004	14,51		
Woche 2	pH7,5a	5	5	0,047	0,000	5,64		
	pH7,5b	5	5	0,047	0,003	5,28	5,20 ± 0,48	3,99 – 6,40
	pH7,5c	5	5	0,041	0,002	4,68		
	pH9,5a	5	5	0,327	0,004	38,73		
	pH9,5b	5	5	0,301	0,005	35,49	38,09 ± 2,34	32,26 – 43,91
	pH9,5c	5	5	0,341	0,007	40,05		
	pH10,5a	5	5	0,251	0,001	29,98		
	pH10,5b	5	5	0,248	0,004	29,26	27,46 ± 3,76	18,13 – 36,79
	pH10,5c	5	5	0,196	0,003	23,14		
Woche 3	pH7,5a	5	5	0,000	0,000	0,00		
	pH7,5b	5	5	0,000	0,000	0,00	0,00 ± 0,00	n.d.
	pH7,5c	5	5	0,000	0,000	0,00		
	pH9,5a	5	5	0,134	0,005	15,47		
	pH9,5b	5	5	0,107	0,005	12,23	14,51 ± 1,98	9,59 – 19,43
	pH9,5c	5	5	0,147	0,015	15,83		
	pH10,5a	5	5	0,110	0,000	13,19		
	pH10,5b	5	5	0,091	0,000	10,91	12,27 ± 1,20	9,29 – 15,25
	pH10,5c	5	5	0,106	0,000	12,71		
Woche 4	pH7,5a	5	5	0,000	0,000	0,00		
	pH7,5b	5	5	0,000	0,000	0,00	0,00 ± 0,00	n.d.
	pH7,5c	5	5	0,000	0,000	0,00		
	pH9,5a	5	5	0,164	0,009	18,59		
	pH9,5b	5	5	0,146	0,006	16,79	18,75 ± 2,04	13,67 – 23,82
	pH9,5c	5	5	0,188	0,014	20,86		
	pH10,5a	5	5	0,166	0,003	19,54		
	pH10,5b	5	5	0,142	0,003	16,67	19,46 ± 2,76	12,61 – 26,32
	pH10,5c	5	5	0,188	0,003	22,18		
Woche 5	pH7,5a	5	5	0,000	0,000	0,00		
	pH7,5b	5	5	0,000	0,000	0,00	0,00 ± 0,00	n.d.
	pH7,5c	5	5	0,000	0,000	0,00		
	pH9,5a	5	5	0,138	0,004	16,07		
	pH9,5b	5	5	0,082	0,001	9,71	11,71 ± 3,78	2,33 – 21,09
	pH9,5c	5	5	0,080	0,002	9,35		

Fortsetzung Tab. 30 pH-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 6	pH10,5a	5	5	0,096	-0,001	11,63	12,07 ± 0,57	10,66 – 13,48
	pH10,5b	5	5	0,098	-0,001	11,87		
	pH10,5c	5	5	0,107	0,001	12,71		
	pH7,5a	5	5	0,000	0,000	0,00	0,00 ± 0,00	n.d.
	pH7,5b	5	5	0,000	0,000	0,00		
	pH7,5c	5	5	0,000	0,000	0,00		
	pH9,5a	5	5	0,210	0,007	24,34	17,47 ± 6,12	2,25 – 32,68
	pH9,5b	5	5	0,132	0,003	15,47		
	pH9,5c	5	5	0,112	0,007	12,59		
	pH10,5a	5	5	0,182	0,002	21,58	26,06 ± 4,06	15,98 – 36,14
	pH10,5b	5	5	0,228	0,002	27,10		
	pH10,5c	5	5	0,249	0,003	29,50		

Tab. 31 pH-Experiment: Microcystingehalte ($\mu\text{g g}^{-1}$) von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	MC-RR	dm-MC-RR	MC-LA	dm-MC-LA	MC-LR	dm-MC-LR	MC-YR	Σ MCs
Woche 2	pH (Woche 0)	380,33	28,16	100,71	17,60	327,01	62,81	8,79	925,42
	pH7,5a	49,55	13,78	74,74	62,61	101,32	44,94	3,61	350,55
	pH7,5b	57,11	15,50	74,54	55,15	111,93	48,29	3,85	366,37
	pH7,5c	55,84	13,45	76,65	47,88	122,34	42,32	3,82	362,29
	pH7,5 (O ± S)	54,17 ± 4,05	14,24 ± 1,10	75,31 ± 1,16	55,21 ± 7,37	111,86 ± 10,51	45,18 ± 2,99	3,76 ± 0,13	359,73 ± 8,22
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	44,11-64,22	11,50-16,98	72,42-78,20	36,91-73,52	85,75-137,97	37,75-52,62	3,44-4,08	339,32-380,15
	pH9,2a	62,76	8,38	44,76	8,00	103,32	28,45	3,31	258,99
	pH9,2b	65,71	9,85	51,79	9,60	109,82	33,25	3,63	283,64
	pH9,2c	68,23	7,79	46,32	7,49	104,52	25,19	3,60	263,14
	pH9,2 (O ± S)	65,57 ± 2,74	8,67 ± 1,06	47,62 ± 3,69	8,37 ± 1,10	105,89 ± 3,46	28,96 ± 4,05	3,51 ± 0,17	268,59 ± 13,20
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	58,77-72,36	6,04-11,31	38,45-56,79	5,63-11,10	97,29-114,48	18,90-39,03	3,09-3,94	235,79-301,39
	pH10,5a	179,96	19,82	66,80	10,28	203,24	32,37	7,13	519,60
Woche 4	pH10,5b	157,47	18,20	66,09	9,91	188,89	33,18	6,36	480,11
	pH10,5c	148,57	16,08	61,43	9,24	178,57	28,80	5,59	448,28
	pH10,5 (O ± S)	162,00 ± 16,18	18,03 ± 1,88	64,77 ± 2,92	9,81 ± 0,53	190,23 ± 12,39	31,45 ± 2,33	6,36 ± 0,77	482,66 ± 35,73
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	121,81-202,19	13,37-22,70	57,52-72,03	8,50-11,13	159,46-221,01	25,65-37,25	4,45-8,27	393,90-571,43
	pH7,5a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH7,5b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH7,5c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH7,5 (O ± S)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH9,2a	27,47	3,51	9,87	1,64	32,70	5,78	1,19	82,16
	pH9,2b	97,79	10,58	33,27	4,53	106,86	14,59	3,54	271,15
	pH9,2c	23,56	2,79	7,74	1,12	25,28	3,82	1,06	65,37
	pH9,2 (O ± S)	49,61 ± 41,77	5,63 ± 4,30	16,96 ± 14,17	2,43 ± 1,84	54,95 ± 45,11	8,06 ± 5,74	1,93 ± 1,39	139,56 ± 114,27
Woche 6	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH10,5a	249,50	31,65	57,83	10,83	278,83	49,82	5,95	684,42
	pH10,5b	241,84	29,11	51,56	8,78	265,45	42,85	5,05	644,63
	pH10,5c	224,25	32,12	54,65	10,67	244,68	47,30	5,35	619,03
	pH10,5 (O ± S)	238,53 ± 12,95	30,96 ± 1,62	54,68 ± 3,14	10,09 ± 1,14	262,99 ± 17,21	46,66 ± 3,53	5,45 ± 0,46	649,36 ± 32,95
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	206,37-270,69	26,93-34,99	46,89-62,47	7,25-12,93	220,24-305,74	37,88-55,43	4,31-6,59	567,51-731,22
	pH7,5a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH7,5b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH7,5c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH7,5 (O ± S)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	pH9,2a	97,95	4,08	35,02	9,69	105,74	14,07	5,00	271,55
Woche 8	pH9,2b	450,00	15,36	93,23	22,86	337,10	40,83	13,90	973,27
	pH9,2c	155,34	5,90	30,53	7,75	123,66	14,98	5,86	344,04
	pH9,2 (O ± S)	234,43 ± 188,88	8,45 ± 6,05	52,93 ± 34,97	13,43 ± 8,22	188,83 ± 128,71	23,29 ± 15,19	8,26 ± 4,91	529,62 ± 385,92
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH10,5a	171,14	7,69	39,32	18,51	169,55	32,21	6,75	445,16
	pH10,5b	211,75	9,42	34,51	13,24	182,26	28,65	6,26	486,10
	pH10,5c	242,39	9,60	47,75	17,27	232,01	32,15	6,71	587,87
	pH10,5 (O ± S)	208,43 ± 35,74	8,90 ± 1,05	40,53 ± 6,70	16,34 ± 2,76	194,61 ± 33,01	31,00 ± 2,03	6,57 ± 0,27	506,38 ± 73,48
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	119,63-297,22	6,29-11,52	23,87-57,18	9,49-23,19	112,60-276,61	25,95-36,06	5,90-7,25	323,82-688,94

Tab. 32 pH-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W0	pH7,5	0,1295	0,1288	0,050	-0,0007	0,0025	36,67	35,33 ± 6,11	20,15 – 50,51
	pH9,5	0,1539	0,1528	0,050	-0,0011	0,0025	28,67		
	pH10,5	0,1520	0,1515	0,050	-0,0005	0,0025	40,67		
Woche 1	pH7,5a	0,1331	0,1336	0,025	0,0005	0,0027	129,33	129,33 ± 0,00	129,33 – 129,33
	pH7,5b	0,1470	0,1475	0,025	0,0005	0,0027	129,33		
	pH7,5c	0,1353	0,1358	0,025	0,0005	0,0027	129,33		
	pH9,5a	0,1508	0,1525	0,025	0,0017	0,0027	177,33	192,00 ± 16,17	151,84 – 232,16
	pH9,5b	0,1255	0,1280	0,025	0,0025	0,0027	209,33		
	pH9,5c	0,1485	0,1505	0,025	0,0020	0,0027	189,33		
Woche 2	pH10,5a	0,1473	0,1486	0,025	0,0013	0,0027	161,33	178,67 ± 16,17	138,51 – 218,83
	pH10,5b	0,1348	0,1369	0,025	0,0021	0,0027	193,33		
	pH10,5c	0,1354	0,1372	0,025	0,0018	0,0027	181,33		
	pH7,5a	0,1471	0,1471	0,025	0,0000	0,0023	90,67	88,00 ± 4,62	76,53 – 99,47
	pH7,5b	0,1300	0,1300	0,025	0,0000	0,0023	90,67		
	pH7,5c	0,1354	0,1352	0,025	-0,0002	0,0023	82,67		
Woche 3	pH9,5a	0,1320	0,1395	0,025	0,0075	0,0023	390,67	392,00 ± 14,05	357,10 – 426,90
	pH9,5b	0,1319	0,1398	0,025	0,0079	0,0023	406,67		
	pH9,5c	0,1523	0,1595	0,025	0,0072	0,0023	378,67		
	pH10,5a	0,1509	0,1580	0,025	0,0071	0,0023	374,67	393,33 ± 16,65	351,96 – 434,71
	pH10,5b	0,1308	0,1387	0,025	0,0079	0,0023	406,67		
	pH10,5c	0,1494	0,1571	0,025	0,0077	0,0023	398,67		

Fortsetzung Tab. 32 pH-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 3	pH7,5a	0,1352	0,1336	0,025	-0,0016	0,0021	18,67	13,33 ± 4,62	1,86 – 24,81
	pH7,5b	0,1537	0,1519	0,025	-0,0018	0,0021	10,67		
	pH7,5c	0,1464	0,1446	0,025	-0,0018	0,0021	10,67		
	pH9,5a	0,1376	0,1430	0,025	0,0054	0,0021	298,67	297,33 ± 10,07	272,32 – 322,34
	pH9,5b	0,1334	0,1390	0,025	0,0056	0,0021	306,67		
	pH9,5c	0,1491	0,1542	0,025	0,0051	0,0021	286,67		
	pH10,5a	0,1526	0,1577	0,025	0,0051	0,0021	286,67	304,00 ± 18,04	259,19 – 348,81
	pH10,5b	0,1504	0,1559	0,025	0,0055	0,0021	302,67		
	pH10,5c	0,1301	0,1361	0,025	0,0060	0,0021	322,67		
Woche 4	pH7,5a	0,1498	0,1475	0,025	-0,0023	0,0024	4,00	10,67 ± 6,11	---
	pH7,5b	0,1332	0,1312	0,025	-0,0020	0,0024	16,00		
	pH7,5c	0,1467	0,1446	0,025	-0,0021	0,0024	12,00		
	pH9,5a	0,1327	0,1386	0,020	0,0059	0,0024	415,00	415,00 ± 20,00	365,31 – 464,69
	pH9,5b	0,1511	0,1574	0,020	0,0063	0,0024	435,00		
	pH9,5c	0,1386	0,1441	0,020	0,0055	0,0024	395,00		
	pH10,5a	0,1486	0,1539	0,020	0,0053	0,0024	385,00	421,67 ± 33,29	338,96 – 504,37
	pH10,5b	0,1322	0,1388	0,020	0,0066	0,0024	450,00		
	pH10,5c	0,1487	0,1549	0,020	0,0062	0,0024	430,00		
Woche 5	pH7,5a	0,1425	0,1406	0,025	-0,0019	0,0023	16,00	72,00 ± 49,96	---
	pH7,5b	0,1369	0,1368	0,025	-0,0001	0,0023	88,00		
	pH7,5c	0,1456	0,1461	0,025	0,0005	0,0023	112,00		
	pH9,5a	0,1411	0,1450	0,025	0,0039	0,0023	248,00	276,00 ± 24,98	213,94 – 338,06
	pH9,5b	0,1251	0,1302	0,025	0,0051	0,0023	296,00		
	pH9,5c	0,1459	0,1507	0,025	0,0048	0,0023	284,00		
	pH10,5a	0,1503	0,1548	0,025	0,0045	0,0023	272,00	276,00 ± 6,93	258,79 – 293,21
	pH10,5b	0,1449	0,1497	0,025	0,0048	0,0023	284,00		
	pH10,5c	0,1302	0,1347	0,025	0,0045	0,0023	272,00		
Woche 6	pH7,5a	0,1304	0,1307	0,025	0,0003	0,0020	90,67	220,00 ± 112,88	---
	pH7,5b	0,1492	0,1540	0,025	0,0048	0,0020	270,67		
	pH7,5c	0,1490	0,1545	0,025	0,0055	0,0020	298,67		
	pH9,5a	0,1520	0,1566	0,015	0,0046	0,0020	437,78	468,89 ± 30,06	394,21 – 543,57
	pH9,5b	0,1510	0,1561	0,015	0,0051	0,0020	471,11		
	pH9,5c	0,1328	0,1383	0,015	0,0055	0,0020	497,78		
	pH10,5a	0,1311	0,1365	0,015	0,0054	0,0020	491,11	437,78 ± 75,72	249,67 – 625,89
	pH10,5b	0,1469	0,1520	0,015	0,0051	0,0020	471,11		
	pH10,5c	0,1327	0,1360	0,015	0,0033	0,0020	351,11		

Tab. 33 pH-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W0	pH7,5	15	1	0,063	0,016	0,38	0,38 ± 0,01	0,36 – 0,40
	pH9,5	15	1	0,060	0,012	0,38		
	pH10,5	15	1	0,062	0,013	0,39		
Woche 1	pH7,5a	5	2	0,058	0,003	2,64	2,62 ± 0,31	1,85 – 3,40
	pH7,5b	5	2	0,063	0,002	2,93		
	pH7,5c	5	2	0,050	0,002	2,30		
	pH9,5a	5	5	0,077	0,004	8,75	8,59 ± 0,73	6,77 – 10,41
	pH9,5b	5	5	0,081	0,004	9,23		
	pH9,5c	5	5	0,068	0,003	7,79		
	pH10,5a	5	5	0,084	0,002	9,83	9,35 ± 0,48	8,16 – 10,54
	pH10,5b	5	5	0,080	0,002	9,35		
	pH10,5c	5	5	0,075	0,001	8,87		
Woche 2	pH7,5a	5	1	0,039	0,002	0,89	0,85 ± 0,09	0,62 – 1,07
	pH7,5b	5	1	0,032	0,001	0,74		
	pH7,5c	5	1	0,037	-0,001	0,91		
	pH9,5a	5	5	0,257	0,006	30,10	30,06 ± 0,42	29,01 – 31,10
	pH9,5b	5	5	0,259	0,005	30,46		
	pH9,5c	5	5	0,249	0,002	29,62		
	pH10,5a	5	5	0,221	0,001	26,38	27,02 ± 0,82	24,99 – 29,05
	pH10,5b	5	5	0,231	-0,002	27,94		
	pH10,5c	5	5	0,221	-0,002	26,74		
Woche 3	pH7,5a	5	1	0,000	0,000	0,00	0,00 ± 0,00	n.d.
	pH7,5b	5	1	0,000	0,000	0,00		
	pH7,5c	5	1	0,000	0,000	0,00		
	pH9,5a	5	5	0,185	0,006	21,46	21,94 ± 0,48	20,75 – 23,13
	pH9,5b	5	5	0,191	0,004	22,42		
	pH9,5c	5	5	0,187	0,004	21,94		
	pH10,5a	5	5	0,132	0,001	15,71	16,63 ± 1,70	12,41 – 20,84
	pH10,5b	5	5	0,130	0,000	15,59		
	pH10,5c	5	5	0,159	0,004	18,59		
Woche 4	pH7,5a	5	1	0,000	0,000	0,00	0,00 ± 0,00	n.d.
	pH7,5b	5	1	0,000	0,000	0,00		
	pH7,5c	5	1	0,000	0,000	0,00		
	pH9,5a	5	5	0,254	0,003	30,10	31,02 ± 1,59	27,06 – 34,97
	pH9,5b	5	5	0,275	0,001	32,85		
	pH9,5c	5	5	0,250	-0,001	30,10		
	pH10,5a	5	5	0,289	-0,005	35,25	38,09 ± 2,46	31,98 – 44,20
	pH10,5b	5	5	0,326	-0,003	39,45		
	pH10,5c	5	5	0,326	-0,004	39,57		
Woche 5	pH7,5a	5	1	0,000	0,000	0,00	0,00 ± 0,00	n.d.
	pH7,5b	5	1	0,000	0,000	0,00		
	pH7,5c	5	1	0,000	0,000	0,00		
	pH9,5a	5	5	0,112	0,003	13,07	13,63 ± 0,48	12,43 – 14,83
	pH9,5b	5	5	0,120	0,004	13,91		
	pH9,5c	5	5	0,117	0,001	13,91		
	pH10,5a	5	5	0,127	-0,002	15,47	15,35 ± 0,32	14,56 – 16,14
	pH10,5b	5	5	0,129	-0,001	15,59		
	pH10,5c	5	5	0,124	-0,001	14,99		

Fortsetzung Tab. 33 pH-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 6	pH7,5a	5	1	0,115	0,005	2,64	3,57 ± 1,01	1,05 – 6,09
	pH7,5b	5	1	0,147	0,004	3,43		
	pH7,5c	5	1	0,200	0,006	4,65		
	pH9,5a	5	5	0,233	0,010	26,74	28,06 ± 1,53	24,25 – 31,86
	pH9,5b	5	5	0,238	0,007	27,70		
	pH9,5c	5	5	0,256	0,008	29,74		
	pH10,5a	5	5	0,311	0,007	36,45	34,21 ± 1,97	29,31 – 39,11
	pH10,5b	5	5	0,285	0,006	33,45		
	pH10,5c	5	5	0,281	0,008	32,73		

Tab. 34 pH-Experiment: Anatoxin-a-Gehalte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Anatoxin-a	mittlere Konzentration von Anatoxin-a (µg g ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 2	pH (Woche 0)	4797,55	4797,55 ± 0,00	4797,55 – 4797,55
	pH7,5a	3883,38	3763,09 ± 144,25	1904,68 – 5621,50
	pH7,5b	3802,72		
	pH7,5c	3603,17		
	pH9,2a	n.d.	n.d.	n.d.
	pH9,2b	n.d.		
	pH9,2c	n.d.		
	pH10,5a	0,25	0,22 ± 0,02	---
	pH10,5b	0,2		
	pH10,5c	0,21		
Woche 4	pH7,5a	n.d.	n.d.	n.d.
	pH7,5b	n.d.		
	pH7,5c	n.d.		
	pH9,2a	n.d.	n.d.	n.d.
	pH9,2b	n.d.		
	pH9,2c	n.d.		
	pH10,5a	n.d.	n.d.	n.d.
	pH10,5b	n.d.		
	pH10,5c	n.d.		
Woche 6	pH7,5a	37,32	14,14 ± 20,14	---
	pH7,5b	4,16		
	pH7,5c	0,94		
	pH9,2a	n.d.	n.d.	n.d.
	pH9,2b	n.d.		
	pH9,2c	n.d.		
	pH10,5a	n.d.	n.d.	n.d.
	pH10,5b	n.d.		
	pH10,5c	n.d.		

Tab. 35 GM-Experiment: Trockengewichte von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	Trocken-gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations-volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht des Filters nach (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken-gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W0	MLA _N	0,1296	0,1303	0,050	0,0007	0,0016	46,00	46,00 ± 0,00	46 – 46
	MLA _N -GM	0,1436	0,1443	0,050	0,0007	0,0016	46,00		
Woche 1	MLA _N a	0,1498	0,1546	0,025	0,0048	0,0026	294,67	305,33 ± 10,07	280,32 – 330,34
	MLA _N b	0,1325	0,1378	0,025	0,0053	0,0026	314,67		
	MLA _N c	0,1503	0,1554	0,025	0,0051	0,0026	306,67		
	MLA _N -GMa	0,1439	0,1496	0,025	0,0057	0,0026	330,67	336,00 ± 9,24	313,05 – 358,95
	MLA _N -GMb	0,1289	0,1350	0,025	0,0061	0,0026	346,67		
	MLA _N -GMc	0,1494	0,1551	0,025	0,0057	0,0026	330,67		
Woche 2	MLA _N a	0,1569	0,1643	0,025	0,0074	0,0024	390,67	416,00 ± 26,03	351,34 – 480,66
	MLA _N b	0,1368	0,1448	0,025	0,0080	0,0024	414,67		
	MLA _N c	0,1561	0,1648	0,025	0,0087	0,0024	442,67		
	MLA _N -GMa	0,1525	0,1608	0,025	0,0083	0,0024	426,67	426,67 ± 8,00	406,79 – 446,54
	MLA _N -GMb	0,1445	0,1530	0,025	0,0085	0,0024	434,67		
	MLA _N -GMc	0,1543	0,1624	0,025	0,0081	0,0024	418,67		
Woche 3	MLA _N a	0,1415	0,1451	0,025	0,0036	0,0023	237,33	254,67 ± 16,17	214,51 – 294,83
	MLA _N b	0,1302	0,1346	0,025	0,0044	0,0023	269,33		
	MLA _N c	0,1404	0,1445	0,025	0,0041	0,0023	257,33		
	MLA _N -GMa	0,1480	0,1550	0,025	0,0070	0,0023	373,33	382,67 ± 19,73	333,65 – 431,69
	MLA _N -GMb	0,1351	0,1429	0,025	0,0078	0,0023	405,33		
	MLA _N -GMc	0,1424	0,1493	0,025	0,0069	0,0023	369,33		
Woche 4	MLA _N a	0,1479	0,1534	0,025	0,0055	0,0022	308,00	349,33 ± 36,30	259,16 – 439,50
	MLA _N b	0,1510	0,1579	0,025	0,0069	0,0022	364,00		
	MLA _N c	0,1398	0,1470	0,025	0,0072	0,0022	376,00		
	MLA _N -GMa	0,1434	0,1547	0,025	0,0113	0,0022	540,00	498,67 ± 35,85	409,60 – 587,73
	MLA _N -GMb	0,1423	0,1521	0,025	0,0098	0,0022	480,00		
	MLA _N -GMc	0,1374	0,1471	0,025	0,0097	0,0022	476,00		
Woche 5	MLA _N a	0,1325	0,1353	0,025	0,0028	0,0023	202,67	197,33 ± 36,30	107,16 – 287,50
	MLA _N b	0,1488	0,1505	0,025	0,0017	0,0023	158,67		
	MLA _N c	0,1451	0,1486	0,025	0,0035	0,0023	230,67		
	MLA _N -GMa	0,1349	0,1394	0,025	0,0045	0,0023	270,67	301,33 ± 60,18	151,83 – 450,83
	MLA _N -GMb	0,1410	0,1453	0,025	0,0043	0,0023	262,67		
	MLA _N -GMc	0,1301	0,1371	0,025	0,0070	0,0023	370,67		
Woche 6	MLA _N a	0,1540	0,1565	0,025	0,0025	0,0027	209,33	268,00 ± 53,27	135,67 – 400,33
	MLA _N b	0,1395	0,1438	0,025	0,0043	0,0027	281,33		
	MLA _N c	0,1470	0,1521	0,025	0,0051	0,0027	313,33		
	MLA _N -GMa	0,1340	0,1387	0,025	0,0047	0,0027	297,33	336,00 ± 63,54	178,15 – 493,85
	MLA _N -GMb	0,1491	0,1539	0,025	0,0048	0,0027	301,33		
	MLA _N -GMc	0,1490	0,1565	0,025	0,0075	0,0027	409,33		

Tab. 36 GM-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W0	MLA _N	15	1	0,432	0,004	3,42	3,60 ± 0,25	2,98 – 4,21
	MLA _N -GM	15	1	0,476	0,004	3,77		
Woche 1	MLA _N a	5	5	0,296	0,001	35,37	36,53 ± 2,77	29,66 – 43,40
	MLA _N b	5	5	0,290	0,002	34,53		
	MLA _N c	5	5	0,332	0,001	39,69		
	MLA _N -GMa	5	5	0,303	-0,001	36,45		
Woche 2	MLA _N -GMb	5	5	0,313	0,002	37,29	37,01 ± 0,48	35,81 – 38,21
	MLA _N -GMc	5	5	0,312	0,001	37,29		
	MLA _N a	5	5	0,444	0,005	52,64		
	MLA _N b	5	5	0,394	0,004	46,76		
Woche 3	MLA _N c	5	5	0,457	0,005	54,20	51,20 ± 3,92	41,46 – 60,94
	MLA _N -GMa	5	5	0,385	0,007	45,32		
	MLA _N -GMb	5	5	0,430	0,008	50,60		
	MLA _N -GMc	5	5	0,411	0,006	48,56		
Woche 4	MLA _N a	5	5	0,236	0,002	28,06	30,50 ± 2,25	24,90 – 36,09
	MLA _N b	5	5	0,265	0,007	30,94		
	MLA _N c	5	5	0,277	0,006	32,49		
	MLA _N -GMa	5	5	0,427	0,003	50,84		
Woche 5	MLA _N -GMb	5	5	0,450	0,001	53,84	52,40 ± 1,50	48,67 – 56,13
	MLA _N -GMc	5	5	0,440	0,002	52,52		
	MLA _N a	5	5	0,350	0,009	40,89		
	MLA _N b	5	5	0,365	0,010	42,57		
Woche 6	MLA _N c	5	5	0,392	0,013	45,44	42,97 ± 2,30	37,24 – 48,69
	MLA _N -GMa	5	5	0,423	0,003	50,36		
	MLA _N -GMb	5	5	0,483	0,004	57,43		
	MLA _N -GMc	5	5	0,419	0,003	49,88		
Woche 7	MLA _N a	5	5	0,181	0,009	20,62	22,98 ± 4,08	12,83 – 33,12
	MLA _N b	5	5	0,183	0,011	20,62		
	MLA _N c	5	5	0,241	0,010	27,70		
	MLA _N -GMa	5	5	0,146	0,005	16,91		
Woche 8	MLA _N -GMb	5	5	0,184	0,008	21,10	24,14 ± 9,14	1,43 – 46,85
	MLA _N -GMc	5	5	0,292	0,005	34,41		
	MLA _N a	5	5	0,265	0,013	30,22		
	MLA _N b	5	5	0,264	0,011	30,34		
Woche 9	MLA _N c	5	5	0,331	0,028	36,33	32,29 ± 3,50	23,61 – 40,98
	MLA _N -GMa	5	5	0,164	0,007	18,82		
	MLA _N -GMb	5	5	0,226	0,015	25,30		
	MLA _N -GMc	5	5	0,364	0,011	42,33		

Tab. 37 GM-Experiment: Microcystingehalte (µg g⁻¹) von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	MC-RR	dm-MC-RR	MC-LA	dm-MC-LA	MC-LR	dm-MC-LR	MC-YR	Σ MCs
Woche 2	GM (Woche 0)	79,74	16,07	12,63	2,33	63,95	15,10	2,74	192,57
	MLA _N a	1,97	0,51	0,57	0,16	1,68	0,51	0,11	5,51
	MLA _N b	3,68	0,92	1,07	0,25	4,46	1,45	n.d.	11,84
	MLA _N c	2,84	0,54	0,87	0,17	3,36	0,99	0,12	8,89
	MLA _N (O ± S)	2,83 ± 0,85	0,66 ± 0,23	0,84 ± 0,25	0,19 ± 0,05	3,17 ± 1,40	0,98 ± 0,47	0,07 ± 0,06	8,74 ± 3,17
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	0,71-4,96	0,08-12,30	0,21-1,47	0,07-0,31	---	---	---	0,87-16,62
	MLA _N -GMa	2,03	0,45	0,53	0,14	1,57	0,41	n.d.	5,12
	MLA _N -GMb	5,22	1,24	1,83	0,42	7,66	1,68	n.d.	18,05
	MLA _N -GMc	6,75	1,59	1,74	0,54	7,65	1,81	n.d.	20,08
	MLA _N -GM (O ± S)	4,67 ± 2,41	1,09 ± 0,59	1,37 ± 0,73	0,36 ± 0,21	5,63 ± 3,52	1,30 ± 0,77	n.d.	14,42 ± 8,11
Woche 4	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	---	---	---	n.d.	---
	MLA _N a	1,19	0,13	0,28	n.d.	1,20	0,39	n.d.	3,20
	MLA _N b	0,30	n.d.	0,04	n.d.	0,22	0,08	n.d.	0,63
	MLA _N c	0,96	n.d.	0,29	n.d.	1,11	0,34	n.d.	2,70
	MLA _N (O ± S)	0,82 ± 0,46	0,04 ± 0,08	0,20 ± 0,14	n.d.	0,84 ± 0,55	0,27 ± 0,17	n.d.	2,18 ± 1,36
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	---	---	n.d.	---	---	n.d.	---
	MLA _N -GMa	0,17	n.d.	0,00	n.d.	0,17	0,05	n.d.	0,39
	MLA _N -GMb	0,41	n.d.	0,03	n.d.	0,29	0,10	0,01	0,85
	MLA _N -GMc	0,35	n.d.	0,17	n.d.	1,01	0,38	0,03	1,95
	MLA _N -GM (O ± S)	0,31 ± 0,13	n.d.	0,07 ± 0,09	n.d.	0,49 ± 0,45	0,18 ± 0,18	0,02 ± 0,02	1,06 ± 0,80
Woche 6	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---
	MLA _N a	0,92	n.d.	0,26	n.d.	1,29	0,47	n.d.	2,94
	MLA _N b	0,46	n.d.	0,07	n.d.	0,44	0,19	n.d.	1,15
	MLA _N c	0,24	n.d.	n.d.	n.d.	0,22	0,11	n.d.	0,57
	MLA _N (O ± S)	0,54 ± 0,35	n.d.	0,11 ± 0,14	n.d.	0,65 ± 0,56	0,25 ± 0,19	n.d.	1,56 ± 1,24
	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	n.d.	---	n.d.	---	---	n.d.	---
	MLA _N -GMa	0,04	n.d.	n.d.	n.d.	0,32	0,18	n.d.	0,55
	MLA _N -GMb	0,31	n.d.	n.d.	n.d.	0,30	0,07	n.d.	0,67
	MLA _N -GMc	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,01	n.d.	0,01
	MLA _N -GM (O ± S)	0,12 ± 0,17	n.d.	n.d.	n.d.	0,20 ± 0,18	0,09 ± 0,09	n.d.	0,41 ± 0,35
Woche 8	Konfidenzintervall ($\alpha = 0,05$)	---	n.d.	n.d.	n.d.	---	---	n.d.	---

Tab. 38 GM-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W0	MLA _N	0,1489	0,1510	0,050	0,0021	0,0016	74,00	74,00 ± 0,00	74,00 – 74,00
	MLA _N -GM	0,1294	0,1315	0,050	0,0021	0,0016	74,00		
Woche 1	MLA _N a	0,1323	0,1367	0,025	0,0044	0,0026	278,67	278,67 ± 4,00	268,73 – 288,60
	MLA _N b	0,1519	0,1564	0,025	0,0045	0,0026	282,67		
	MLA _N c	0,1492	0,1535	0,025	0,0043	0,0026	274,67		
	MLA _N -GMa	0,1273	0,1331	0,025	0,0058	0,0026	334,67		
	MLA _N -GMb	0,1524	0,1569	0,025	0,0045	0,0026	282,67		
	MLA _N -GMc	0,1354	0,1405	0,025	0,0051	0,0026	306,67		

Fortsetzung Tab. 38 GM-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
Woche 2	MLA _N a	0,1394	0,1480	0,025	0,0086	0,0024	438,67	421,33 ± 67,69	253,18 – 589,49
	MLA _N b	0,1598	0,1694	0,025	0,0096	0,0024	478,67		
	MLA _N c	0,1537	0,1600	0,025	0,0063	0,0024	346,67		
Woche 2	MLA _N -GMa	0,1456	0,1511	0,025	0,0055	0,0024	314,67	321,33 ± 26,63	255,17 – 387,50
	MLA _N -GMb	0,1595	0,1659	0,025	0,0064	0,0024	350,67		
	MLA _N -GMc	0,1424	0,1475	0,025	0,0051	0,0024	298,67		
Woche 3	MLA _N a	0,1332	0,1380	0,025	0,0048	0,0023	285,33	288,00 ± 8,33	267,31 – 308,69
	MLA _N b	0,1470	0,1517	0,025	0,0047	0,0023	281,33		
	MLA _N c	0,1476	0,1527	0,025	0,0051	0,0023	297,33		
Woche 3	MLA _N -GMa	0,1377	0,1419	0,025	0,0042	0,0023	261,33	261,33 ± 4,00	251,40 – 271,27
	MLA _N -GMb	0,1427	0,1470	0,025	0,0043	0,0023	265,33		
	MLA _N -GMc	0,1355	0,1396	0,025	0,0041	0,0023	257,33		
Woche 4	MLA _N a	0,1451	0,1527	0,025	0,0076	0,0022	392,00	425,33 ± 36,30	335,16 – 515,50
	MLA _N b	0,1345	0,1439	0,025	0,0094	0,0022	464,00		
	MLA _N c	0,1438	0,1521	0,025	0,0083	0,0022	420,00		
Woche 4	MLA _N -GMa	0,1410	0,1488	0,025	0,0078	0,0022	400,00	382,67 ± 30,02	308,08 – 457,25
	MLA _N -GMb	0,1317	0,1382	0,025	0,0065	0,0022	348,00		
	MLA _N -GMc	0,1457	0,1535	0,025	0,0078	0,0022	400,00		
Woche 5	MLA _N a	0,1441	0,1481	0,025	0,0040	0,0023	250,67	265,33 ± 16,17	225,17 – 305,49
	MLA _N b	0,1406	0,1454	0,025	0,0048	0,0023	282,67		
	MLA _N c	0,1343	0,1386	0,025	0,0043	0,0023	262,67		
Woche 5	MLA _N -GMa	0,1432	0,1470	0,025	0,0038	0,0023	242,67	250,67 ± 36,66	159,59 – 341,74
	MLA _N -GMb	0,1294	0,1344	0,025	0,0050	0,0023	290,67		
	MLA _N -GMc	0,1404	0,1436	0,025	0,0032	0,0023	218,67		
Woche 6	MLA _N a	0,1373	0,1467	0,025	0,0094	0,0027	485,33	472,00 ± 19,73	422,98 – 521,02
	MLA _N b	0,1457	0,1550	0,025	0,0093	0,0027	481,33		
	MLA _N c	0,1374	0,1459	0,025	0,0085	0,0027	449,33		
Woche 6	MLA _N -GMa	0,1434	0,1507	0,025	0,0073	0,0027	401,33	397,33 ± 46,13	282,73 – 511,94
	MLA _N -GMb	0,1488	0,1571	0,025	0,0083	0,0027	441,33		
	MLA _N -GMc	0,1377	0,1437	0,025	0,0060	0,0027	349,33		

Tab. 39 GM-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665$ nm	$\lambda = 750$ nm	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W0	MLA _N	15	1	0,274	0,012	2,09	2,17 ± 0,10	1,91 – 2,42
	MLA _N -GM	15	1	0,285	0,005	2,24		
Woche 1	MLA _N a	5	5	0,177	0,001	21,10	22,14 ± 0,91	19,89 – 24,40
	MLA _N b	5	5	0,194	0,006	22,54		
	MLA _N c	5	5	0,189	-0,001	22,78		
Woche 1	MLA _N -GMa	5	5	0,222	0,005	26,02	27,18 ± 2,11	21,93 – 32,43
	MLA _N -GMb	5	5	0,222	0,006	25,90		
	MLA _N -GMc	5	5	0,252	0,005	29,62		
Woche 2	MLA _N a	5	5	0,385	0,005	45,56	46,80 ± 1,33	43,51 – 50,10
	MLA _N b	5	5	0,406	0,004	48,20		
	MLA _N c	5	5	0,394	0,005	46,64		
Woche 2	MLA _N -GMa	5	5	0,284	0,007	33,21	31,57 ± 1,68	27,40 – 35,75
	MLA _N -GMb	5	5	0,272	0,008	31,65		
	MLA _N -GMc	5	5	0,255	0,006	29,86		
Woche 3	MLA _N a	5	5	0,144	0,001	17,15	18,23 ± 1,30	15,00 – 21,45
	MLA _N b	5	5	0,149	0,000	17,87		
	MLA _N c	5	5	0,167	0,003	19,66		
Woche 3	MLA _N -GMa	5	5	0,137	-0,003	16,79	17,51 ± 1,46	13,88 – 21,13
	MLA _N -GMb	5	5	0,136	-0,002	16,55		
	MLA _N -GMc	5	5	0,160	0,000	19,18		
Woche 4	MLA _N a	5	5	0,222	0,005	26,02	29,46 ± 2,98	22,06 – 36,85
	MLA _N b	5	5	0,260	0,000	31,18		
	MLA _N c	5	5	0,268	0,008	31,18		
Woche 4	MLA _N -GMa	5	5	0,256	0,004	30,22	29,66 ± 0,97	27,25 – 32,06
	MLA _N -GMb	5	5	0,252	0,000	30,22		
	MLA _N -GMc	5	5	0,243	0,005	28,54		
Woche 5	MLA _N a	5	5	0,150	0,001	17,87	17,99 ± 0,79	16,03 – 19,94
	MLA _N b	5	5	0,149	0,005	17,27		
	MLA _N c	5	5	0,160	0,003	18,82		
Woche 5	MLA _N -GMa	5	5	0,111	0,002	13,07	13,27 ± 1,51	9,52 – 17,02
	MLA _N -GMb	5	5	0,125	0,001	14,87		
	MLA _N -GMc	5	5	0,103	0,004	11,87		
Woche 6	MLA _N a	5	5	0,312	0,011	36,09	36,25 ± 0,39	35,29 – 37,21
	MLA _N b	5	5	0,321	0,015	36,69		
	MLA _N c	5	5	0,300	0,000	35,97		
Woche 6	MLA _N -GMa	5	5	0,168	0,003	19,78	24,30 ± 4,89	12,15 – 36,45
	MLA _N -GMb	5	5	0,251	0,005	29,50		
	MLA _N -GMc	5	5	0,196	-0,001	23,62		

Tab. 40 Kryo-Experiment: Trockengewichte von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W.3	AB2005/31(1)	0,1488	0,1513	0,050	0,0025	0,0026	101,33	106,00 ± 5,03	93,50 – 118,50
	AB2005/31(2)	0,1407	0,1437	0,050	0,0030	0,0026	111,33		
	AB2005/31(3)	0,1519	0,1546	0,050	0,0027	0,0026	105,33		
W.4	AB2005/31(1)	0,1301	0,1357	0,050	0,0056	0,0022	156,00	152,00 ± 6,93	134,79 – 169,21
	AB2005/31(2)	0,1472	0,1522	0,050	0,0050	0,0022	144,00		
	AB2005/31(3)	0,1319	0,1375	0,050	0,0056	0,0022	156,00		

Tab. 41 Kryo-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *M. aeruginosa* AB2005/31

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W 3	AB2005/31(1)	5	5	0,102	0,005	11,63	11,23 ± 0,42	10,18 – 12,28
	AB2005/31(2)	5	5	0,095	0,005	10,79		
	AB2005/31(3)	5	5	0,096	0,002	11,27		
W 4	AB2005/31(1)	5	5	0,174	0,003	20,50	21,10 ± 0,55	19,74 – 22,47
	AB2005/31(2)	5	5	0,184	0,004	21,58		
	AB2005/31(3)	5	5	0,181	0,004	21,22		

Tab. 42 Kryo-Experiment: Trockengewichte von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	Trocken- gewicht des Filters (g)	Rückwaage nach Filtration und Trocknung (g)	Filtrations- volumen (l)	Rückwaage - Trockengewicht (g)	Gewichtsverlust des Filters nach Trocknung (g)	Trocken- gewicht (mg l ⁻¹)	mittleres Trockengewicht ± S (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W 3	SAG30.87(1)	0,1380	0,1419	0,050	0,0039	0,0026	129,33	146,67 ± 15,14	109,04 – 184,29
	SAG30.87(2)	0,1491	0,1542	0,050	0,0051	0,0026	153,33		
	SAG30.87(3)	0,1341	0,1394	0,050	0,0053	0,0026	157,33		
W 4	SAG30.87(1)	0,1438	0,1518	0,050	0,0080	0,0022	204,00	232,00 ± 24,98	169,94 – 294,06
	SAG30.87(2)	0,1319	0,1417	0,050	0,0098	0,0022	240,00		
	SAG30.87(3)	0,1360	0,1464	0,050	0,0104	0,0022	252,00		

Tab. 43 Kryo-Experiment: Gehalt an Chlorophyll-a von *A. flos-aquae* SAG30.87

	Probe	V Kultur (ml)	V EtOH (ml)	$\lambda = 665 \text{ nm}$	$\lambda = 750 \text{ nm}$	Chl.-a (mg l ⁻¹)	mittlere Chl.-a Konz. (mg l ⁻¹)	Konfidenzintervall (mg l ⁻¹) beim Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (t-Verteilung)
W 3	SAG30.87(1)	5	5	0,292	0,003	34,65	38,73 ± 3,63	29,71 – 47,74
	SAG30.87(2)	5	5	0,350	0,003	41,61		
	SAG30.87(3)	5	5	0,336	0,003	39,93		
W 4	SAG30.87(1)	5	5	0,334	0,004	39,57	45,32 ± 6,01	30,39 – 60,25
	SAG30.87(2)	5	5	0,378	0,004	44,84		
	SAG30.87(3)	5	5	0,435	0,005	51,56		

Tab. 44 Ausbeute an Microcystinen (µg) je Liter Kulturmedium von *M. aeruginosa* AB2005/31

Experimente	Woche 0	Woche 2	Woche 4	Woche 6
N0	59,54 ± 5,58	178,69 ± 5,14	6,80 ± 14,04	8,18 ± 2,47
N1	59,54 ± 5,58	212,60 ± 21,07	72,21 ± 37,14	236,84 ± 86,81
N2	59,54 ± 5,58	159,54 ± 38,22	29,44 ± 24,71	155,85 ± 106,74
N3	59,54 ± 5,58	118,18 ± 13,35	42,05 ± 39,47	171,24 ± 158,59
N4	59,54 ± 5,58	102,54 ± 15,84	64,96 ± 45,52	210,78 ± 89,42
N5	59,54 ± 5,58	103,34 ± 35,93	178,17 ± 35,85	240,22 ± 114,64
P1	109,60 ± 10,66	722,40 ± 120,49	1047,99 ± 164,50	816,98 ± 189,55
P2	109,60 ± 10,66	724,92 ± 79,83	386,87 ± 74,57	256,06 ± 54,95
P3	109,60 ± 10,66	800,01 ± 132,06	516,98 ± 205,17	399,13 ± 224,08
P4	109,60 ± 10,66	463,03 ± 98,63	346,15 ± 90,42	164,93 ± 84,06
pH 7,5	64,16 ± 8,48	91,61 ± 7,28	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
pH 9,2	64,16 ± 8,48	118,18 ± 13,35	42,05 ± 39,47	171,24 ± 159,59
pH 10,5	64,16 ± 8,48	194,35 ± 22,80	232,04 ± 31,27	247,28 ± 64,42
MLA _N	8,86 ± 0,00	3,64 ± 1,55	0,76 ± 0,55	0,42 ± 0,41
MLA _N -GM	8,86 ± 0,00	6,15 ± 3,58	0,53 ± 0,44	0,14 ± 0,14

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Bernd Luckas für die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation sowie die konstruktiven, fachlichen und bisweilen polarisierenden gesellschaftspolitischen, historischen und wissenschaftskritischen Diskussionen und Anregungen. Besonders verdanke ich ihm meine eindrucksvollen Forschungsaufenthalte in der südamerikanischen Metropole São Paulo sowie die Ermöglichung der Teilnahme an internationalen Kongressen. Dank gebührt allen MitarbeiterInnen des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie, die mich während meiner Zeit begleitet haben, namentlich, Katrin Erler, Elke Stoll, Dr. Bernd Christian, Dr. Susann Hiller, Dr. Marc Diener, Nicole Fritz, Tina Helbig, Karin Röder sowie meinen DiplomandInnen Sebastian Harraß, Britta Lichti, Bettina Mönch, Steven Oppenhäuser und besonders Nadine Hölzel, die wesentliche Arbeiten bezüglich der Kultivierungsversuche leistete. Ferner danke ich Prof. Dr. Ralf Oelmüller sowie den aktuellen und ehemaligen MitarbeiterInnen des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie, namentlich, Dr. Bationa Shahollari, Yvonne Venus, Dr. Paul Hein, Dr. Raik Wagner, Sebastian Steiner, Yvonne Schröter, Corinna Drzewiecki, Iris Camehl, Ute Holtzegel, Joy Michal Johnson, Meta Brost, Heide Becker sowie PD Dr. Klaus-J. Appenroth und PD Dr. Thomas Pfannschmidt für ihre freundliche Unterstützung und Bereitstellung der Infrastruktur für die Kultivierung meiner Cyanobakterien. Mein Dank gilt Prof. Dr. Ernani Pinto, Augusto Felipe Dörr, Diogo de Oliveira Silva, Stella Bortoli, Fabyana Maria dos Anjos, Sidnei Moura e Silva, Vania Cristina Rodríguez Salazar und Vanessa Gressler von der Universität São Paulo (Brasilien) für die erfahrungsträchtigen und wissenschaftlichen Anregungen sowie die warmherzige Gastfreundschaft. Dank schulde ich all jenen, die mir vitale Kulturen und Probenmaterial zur Verfügung gestellt haben, insbesondere Prof. Dr. Claudia Wiegand, PD Dr. Stephan Pflugmacher (beide Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin), Dr. Norbert Wasmund (Leibniz-Institut für Ostseeforschung, Warnemünde), Prof. Dr. Gerd Liebezeit (Terramare, Wilhelmshaven), Dr. Hanna Mazur-Marzec (Universität Gdansk, Polen), Dr. Alexander Piek (Fachhochschule Lausitz), PD Dr. Sabine Mundt (Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) und Dipl.-Ing. Reiner Zollmarsch. Besonderer Dank gilt meinen Eltern Heidi und Friedrich Krüger, meiner Schwester Antje und vor allem meiner Freundin Nadine sowie meinem Freundeskreis. Ihr empathischer Beistand und ihre Zuversicht ermutigten zur Fertigstellung der Dissertation.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit gebe ich mein Ehrenwort,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe,

dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe,

dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,

dass ich die vorliegende Arbeit weder komplett noch in Form einer in wesentlichen Teilen ähnlichen oder anderen Abhandlung bei der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder einer anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit für eine staatliche oder wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Jena, 05.01.2010

Thomas Krüger

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Geburtsdatum / -ort:	6. März 1981 in Gardelegen
Eltern:	Friedrich Krüger (Bauingenieur), Heidi Krüger (Erzieherin)
Geschwister:	Antje Krüger (Juristin)
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1987 - 1991	Grundschule („Karl-Marx-Oberschule“) Gardelegen
1991 - 1999	Geschwister-Scholl-Gymnasium Gardelegen
10.07.1999	Erlangung der Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst

08/1999 - 06/2000	Zivildienst im Wohnheim „Schillerstraße“ der Lebenshilfe e.V. in Gardelegen
-------------------	---

Studium

10/2000 - 01/2006	Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
17.01.2006	Erlangung des Grades eines Diplom-Trophologen

Postgraduale Ausbildung

seit 07.06.2006	Beginn der Arbeiten an der Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie (Prof. Dr. B. Luckas) der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena
10/2007, 10/2008 & 11/2009	Forschungsaufenthalte an der <i>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas</i> der Universität São Paulo, Brasilien, bei Prof. Dr. Ernani Pinto

Jena, 05.01.2010

Thomas Krüger